



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/60, 15/63, C12P 21/08, C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO99/05292 (43) 国際公開日 1999年2月4日(04.02.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03280 (22) 国際出願日 1998年7月22日(22.07.98) (30) 優先権データ 特願平9/212624 1997年7月22日(22.07.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 加藤茂明(KATO, Shigeaki)[JP/JP] 〒359-1121 埼玉県所沢市元町13-2 Saitama, (JP) 武山健一(TAKEYAMA, Ken-ichi)[JP/JP] 〒114-0003 東京都北区豊島1-22-7 マリポーザ伊勢屋701号 Tokyo, (JP) 北中幸子(KITANAKA, Sachiko)[JP/JP] 〒166-0003 東京都杉並区高円寺南1-24-14 ヴィンテージ高円寺南504号 Tokyo, (JP)		(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市鉦町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP) (81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: METHOD FOR GENE SCREENING WITH THE USE OF NUCLEAR RECEPTORS (54)発明の名称 核内受容体を利用した遺伝子スクリーニング方法 (57) Abstract Construction has been successfully made of a system whereby, when a ligand is formed by the expression of a protein capable of converting a ligand precursor into the ligand, the ligand thus formed is bound to a nuclear receptor to thereby induce the expression of a reporter gene located downstream of the target sequence. By examining gene libraries with the use of this system, genes encoding proteins capable of converting a ligand precursor into a ligand in practice have been successfully isolated. Application of this system with the use of the transcriptional regulation by nuclear receptors makes it possible to screen ligands binding to nuclear receptors, to examine whether or not a test compound is a ligand binding to nuclear receptors, and to screen genes encoding proteins capable of converting an inactive transcriptional regulatory factor into the active one over a wide range.		

(57)要約

リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質の発現によってリガンドが生成された場合に、該リガンドが核内受容体と結合し、その標的配列の下流のレポーター遺伝子を発現させるシステムの構築に成功した。さらに、このシステムを利用して遺伝子ライブラリーの検索を行い、実際にリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子を単離することに成功した。また、本発明者らは、核内受容体の転写制御を利用したこのシステムを応用すれば、核内受容体に結合するリガンドのスクリーニングや被検化合物が核内受容体に結合するリガンドであるか否かの検査を行うこと、さらには、広く転写調節因子において、その不活性型から活性型への変換を行うタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニングを行うことが可能であることを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン						

明細書

核内受容体を利用した遺伝子スクリーニング方法

技術分野

本発明は、転写調節因子、主として核内受容体の性質を利用した化合物のスクリーニング方法、および化合物の検査方法に関する。

より詳細には、リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法、該スクリーニング方法により単離しうるリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質およびその遺伝子、並びに被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法に関する。また、核内受容体に結合するリガンドをスクリーニングする方法、該スクリーニング方法により単離しうるリガンド、および被検化合物が核内受容体のリガンドであるか否かを検査する方法に関する。さらに、不活性型転写調節因子を活性型転写調節因子に変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

ビタミンDのホルモン型であり、最も生物学的活性の高い天然の代謝産物である $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミンD₃ ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (A. W. Norman, J. Roth, L. Orchi, Endocr Rev. 3, 331 (1982); H. F. DeLuca, Adv Exp Med Biol. 196, 361 (1986); M. R. Walters, Endocr Rev. 13, 719 (1992))は、連続的な水酸化によって生成される。すなわち、まず最初に肝臓で水酸化されて25-ヒドロキシビタミンD₃ ($25(\text{OH})\text{D}_3$) が生じ、続いて腎臓で水酸化されて $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が生じる (H. Kawashima, S. Torikai, K. Kurokawa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1199 (1981); H. L. Henry et al., J. CellBiochem. 49, 4 (1992))。ビタミン

D受容体（以下、「VDR」と略記する）へ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が結合することによってVDRのトランス活性化作用が引き起こされ(M. Beato, P. Herrlich, G. Schuts, Cell 83, 851 (1995); H. Darwish and H. F. DeLuca, Eukaryotic Gene Exp. 3, 89 (1993); B. D. Lemon, J. D. Fondell, L. P. Freedman, Mol. Cell. Biol. 17, 1923 (1997))、その結果として、カルシウムホメオスタシス、細胞分裂及び細胞増殖のようなビタミンDの作用の大部分を行う一連の標的遺伝子の転写が調節される(D. D. Bikle and S. Pillai, Endoc. Rev. 14, 3 (1992); R. Bouillon, W. H. Okamura, A. W. Norman, Endoc. Rev. 16, 200 (1995); M. T. Haussler et al., Recent Prog. Horm. Res. 44, 263 (1988); P. J. Malloy et al, J. Clin. Invest. 86, 2071 (1990))。腎における $25(\text{OH})\text{D}_3$ の水酸化が、活性ビタミンDの合成に重要であることが示されており、それは、腎臓の近位尿細管に特に局在している $25(\text{OH})\text{D}_3$ 1α 水酸化酵素 ($1\alpha(\text{OH})$ アーゼ) によって行われる、とかなり以前より考えられている。腎の $1\alpha(\text{OH})$ アーゼの活性は、その最終産物である $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により負の調節を受け(Y. Tanaka and H. F. DeLuca, Science 183, 1198 (1974); K. Ikeda, T. Shinki, A. Yamaguchi, H. F. DeLuca, K. Kurokawa, T. Suda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6112 (1995); H. L. Henry, R. J. Midgett, A. W. Norman, J. Biol. Chem. 249, 7584 (1974))、カルシトニン及びPTHのようなカルシウム調節に関与するペプチドホルモンにより正の調節を受ける(H. Kawashima, S. Torikai, K. Kurokawa, Nature 291, 327 (1981); K. W. Colston, I. M. Evans, L. Galauto, I. Macintyre, D. W. Moss, Biochem. J 134, 817 (1973); D. R. Fraser and E. Kodicek, Nature 241, 163 (1973); M. J. Beckman, J. A. Johnson, J. P. Goff, T. A. Reinhardt, D. C. Beitz, R. L. Horst, Arch. Biochem. Biophys. 319, 535 (1995))。これらのホルモンによる $1\alpha(\text{OH})$ アーゼ活性の複雑な調節によって、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の血清レベルは、最終的には一定に維持されている。ビタミンDの作用においてこの酵素がインビボで重要であることは、遺伝子病、ビタミンD依存性I型くる病(D. Fraser, S. W. Kooh,

H. P. Kind, M. F. Hollick, Y. Tanaka, H. F. DeLuca, N. Engl. J. Med. 289, 817 (1973); S. Balsan, in Rickets, F. H. Glorieux, Ed. (Raven, New York, 1991), pp155165.)の原因が $1\alpha(\text{OH})$ アーゼ遺伝子の突然変異であると考えられることから、さらに明白である。部分精製した $1\alpha(\text{OH})$ アーゼ蛋白質の生化学的解析 (S. Wakino et al, Gerontology 42, 67 (1996); Eva Axen, FEBS lett 375, 277 (1995); M. BurgosTrinidad, R. Ismaili, R. A. Ettinger, J. M. Pahl, H. F. DeLuca, J. Biol. Chem. 267, 3498 (1992); M. Warner et al., J. Biol. Chem. 257, 12995 (1982))により、この酵素がP450ファミリーに属することが強く示唆されたが、この生化学的特性、及び $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により負のフィードバックが発現する分子的機構については、酵素の精製が困難であり、cDNAがクローニングされていないことから、不明な点が多い。そこで、これまで $1\alpha(\text{OH})$ アーゼのcDNAの単離が望まれてきた。近年になってラットにおいてビタミンDの 1α 位を水酸化する酵素が単離されたという報告がなされている (J. Bone Min. Res. Vol11(sup 1)117(1996))。

ところで、上記の $1\alpha(\text{OH})$ アーゼも含め、特定の核内受容体に直接もしくは間接的に作用するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする従来の方法としては、主として細胞内情報伝達因子のリン酸化や膜受容体のイオンチャンネルなどを指標とした手法が用いられてきた。具体的には、適当な発現ベクターに挿入されたcDNAライブラリーやcDNAを細胞や単一な個体（例えば、アフリカツメガエルの卵母細胞など）に導入し、リン酸化、細胞増殖、イオンチャンネルを介した電流の変化を指標としたスクリーニングが行われていた。

しかしながら、これらの方法で目的の遺伝子を単離することは非常に困難であった。特に、酵素自身の発現クローニングは検出可能な指標が限られているため、高度な手法が要求されていた。このため簡便かつ効率的なスクリーニング方法の開発が望まれていた。

発明の開示

本発明は、リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子を簡便かつ効率的にスクリーニングする方法、および被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを簡便に検査する方法を提供することを課題とする。また、該スクリーニング法を用いて、リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質およびその遺伝子を単離することを課題とする。

さらに、本発明は、上記のスクリーニング法および検査法を応用した、核内受容体に結合するリガンドをスクリーニングする方法、および被検化合物が核内受容体のリガンドであるか否かを検査する方法、並びに不活性型転写調節因子を活性型転写調節因子に変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

本発明者等は、上記課題を解決すべく、リガンドの結合により転写因子として機能する核内受容体の特性に着目して鋭意研究を行った結果、リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質の発現によってリガンドが生成された場合に、該リガンドが核内受容体と結合し、その標的配列の下流のレポーター遺伝子を発現させるシステムの構築に成功した。さらに、このシステムを利用して遺伝子ライブラリーの検索を行い、実際にリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子を単離することに成功した。

具体的には、本発明者等は、GAL4のDNA結合ドメインとビタミンD受容体のリガンド結合ドメインとを含む融合タンパク質をコードする遺伝子を有するベクター、およびGAL4のDNA結合ドメインの結合配列の下流にレポーターであるlacZ遺伝子が接続されているベクターを構築し、これらベクターを細胞へ導入した。次いで、これら細胞にcDNAライブラリーを導入し、ビタミンD前駆体を添加して、レポーター活性の検出を行った。そして、レポーター活性の検出されたクローンを選抜し、選抜したクローンが実際にビタミンD前駆体をビタミンDへ変換する活性を有する

か否かにつき検討を行ったところ、単離したクローンの1つが実際にこの活性を有することを見いだした。

また、本発明者らは、核内受容体の転写制御を利用したこのシステムを応用すれば、核内受容体に結合するリガンドのスクリーニングや被検化合物が核内受容体に結合するリガンドであるか否かの検査を行うことが可能であることを見いだした。即ち、上記システムにおいて、リガンドの前駆体および該前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子を含む遺伝子のライブラリーに代えて、例えば、被検化合物のライブラリーを用いれば、被検化合物がリガンドとして機能した場合に、核内受容体がレポーター遺伝子の転写を促進するため、レポーター活性を指標に被検化合物のライブラリー中からリガンドとして機能する化合物を簡便に検出し、スクリーニングすることが可能であることを見いだした。

さらに、本発明者らは、核内受容体の転写制御を利用したこのシステムを応用することにより、広く転写調節因子において、その不活性型から活性型への変換を行うタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングすることも可能であることを見出した。即ち、本発明者らは、リガンドとの結合により活性化する核内受容体に限らず、例えば、リン酸化により活性化する転写調節因子など、広く、不活性型と活性型の両形態が存在する転写調節因子において、転写制御を利用したシステムを利用して、その活性化に関与する因子を単離しうることを見出した。

本発明は、より具体的には、

- (1) 核内受容体をコードする遺伝子を有するベクターおよび該核内受容体の結合配列の下流にレポーター遺伝子が接続されているベクターが導入された細胞、
- (2) 核内受容体がビタミンD受容体である、(1)に記載の細胞、
- (3) 核内受容体のDNA結合ドメインと核内受容体のリガンド結合ドメインとを含む融合タンパク質をコードする遺伝子を有するベクターおよび該核内受容体のDNA結合ドメインの結合配列の下流にレポーター遺伝子が接続されているベクターが導入された細胞、

(4) 核内受容体のDNA結合ドメインがGAL4に由来する、(3)に記載の細胞、

(5) 核内受容体のリガンド結合ドメインがビタミンD受容体に由来する、

(3)に記載の細胞、

(6) 核内受容体に結合するリガンドをスクリーニングする方法であって、

(A) (1)乃至(5)のいずれかに記載の細胞に被検化合物を作用させる工程、

(B) レポーター活性を検出する工程、

(C) レポーター活性が検出された細胞に作用させた被検化合物を選択する工程、

を含む方法、

(7) 被検化合物が核内受容体に結合するリガンドであるか否かを検査する方法であって、

(A) (1)乃至(5)のいずれかに記載の細胞に被検化合物を作用させる工程、

(B) レポーター活性を検出する工程、

を含む方法、

(8) リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法であって、

(A) (1)乃至(5)のいずれかに記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、

(B) (A)の工程により被検遺伝子が導入された細胞にリガンドの前駆体を作用させる工程、

(C) レポーター活性を検出する工程、

(D) レポーター活性が検出された細胞から被検遺伝子を単離する工程、

を含む方法、

(9) 被検遺伝子が、リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法であって、

(A) (1) 乃至 (5) のいずれかに記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、
(B) (A) の工程により被検遺伝子が導入された細胞にリガンドの前駆体を作用させる工程、

(C) レポーター活性を検出する工程、
を含む方法、

(10) 非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法であって、

(A) (2) または (5) に記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、
(B) (A) の工程により被検遺伝子が導入された細胞に非活性型ビタミンD₃を作用させる工程、

(C) レポーター活性を検出する工程、
(D) レポーター活性が検出された細胞から被検遺伝子を単離する工程、
を含む方法、

(11) 被検遺伝子が、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法であって、

(A) (2) または (5) に記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、
(B) (A) の工程により被検遺伝子が導入された細胞に非活性型ビタミンD₃を作用させる工程、

(C) レポーター活性を検出する工程、
を含む方法、

(12) (6) に記載の方法により単離しうる、核内受容体に結合するリガンド、

(13) (8) に記載の方法により単離しうる、リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子、

(14) (10) に記載の方法により単離しうる、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換するタンパク質をコードする遺伝子、

(15) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列からなり、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質、

(16) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列からなり、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質、

(17) 配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質、

(18) 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質、

(19) (15)乃至(18)のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA、

(20) 配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質をコードするDNA、

(21) 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質をコードするDNA、

(22) (19)乃至(21)のいずれかに記載のDNAを含むベクター、

(23) (19)乃至(21)のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体、

(24) (23)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(15)乃至(18)のいずれかに記載のタンパク質の生産方法、

(25) (15)乃至(18)のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体、

(26) 不活性型転写調節因子を活性型転写調節因子に変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法であって、

(A) 不活性型転写調節因子をコードする遺伝子を有するベクターおよび該不活性型転写調節因子の結合配列の下流にレポーター遺伝子が接続されているベクターが導入されている細胞に被検遺伝子を導入する工程、

(B) レポーター活性を検出する工程、

(C) レポーター活性が検出された細胞から被検遺伝子を単離する工程、を含む方法。

(27) 不活性型転写調節因子が、非リン酸化NF κ BとI κ Bとの複合体、非リン酸化HSTF、または非リン酸化AP1である、(26)記載の方法、に関する。

なお、本発明において「リガンド」とは、核内受容体に結合することにより、核内受容体の標的遺伝子の転写活性化能を制御する化合物を指し、天然に存在するものに限られず、人工的に合成されたものも含まれる。

また、本発明において「核内受容体」とは、標的遺伝子のプロモーター上流に結合することにより、リガンド依存的に標的遺伝子の転写を制御する因子を指す。

また、本発明における「リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質」には、リガンド前駆体に直接作用してリガンドへ変換するタンパク質のみならず、間接的に変換するタンパク質、例えば、リガンドの前駆体に直接作用しリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質を活性化するタンパク質も含まれる。

また、本発明において「転写調節因子」とは、標的遺伝子のプロモーター上流に結合することにより、標的遺伝子の転写を制御する因子を指す。従って、上記の核内受容体も本発明の転写調節因子に含まれる。

また、本発明における「不活性型転写調節因子を活性型転写調節因子に変換するタンパク質」には、不活性型転写調節因子に直接作用して活性型転写調節因子へ変換するタンパク質のみならず、間接的に変換するタンパク質も含まれる。例

例えば、非活性型転写調節因子がリン酸化により活性型となる場合には、このリン酸化に直接関与するタンパク質のみならず、リン酸化を行うタンパク質を活性化することにより間接的に不活性型転写調節因子を活性型へ変換するタンパク質も、本発明の「不活性型転写調節因子を活性型転写調節因子に変換するタンパク質」に含まれる。

本発明は、第一に、リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法、および被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法に関する。これら方法においては、まず、核内受容体をコードする遺伝子を有するベクター（以下、「第一発現ユニット」と称する）、および該核内受容体の結合配列の下流にレポーター遺伝子が接続されているベクター（以下、「第二発現ユニット」と称する）が導入された細胞を調製し、該細胞に被検遺伝子を導入する。

第一発現ユニットにおける「核内受容体をコードする遺伝子」としては、特に制限はなく、種々の核内受容体の遺伝子を用いることが可能である。例えば、後述する核内受容体に結合する未知のリガンドのスクリーニングや被検化合物が核内受容体に結合するリガンドであるか否かの検査において、核内受容体として、PPAR、LXR、FXR、MB67、ONR、NUR、COUP、TR2、HNF4、ROR、Rev-erb、ERR、Ftz-F1、Tlx、GCNFなどのオーファン受容体（蛋白質 核酸 酵素 Vol.41 No.8 p1265-1272(1996)）を用いれば、その天然または人工的に合成されたりガンドを検出し、単離することができる。また、後述するリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニングや、被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かの検査などに用いる場合には、そのリガンドおよびリガンドの前駆体が知られているVDR（ビタミンD受容体）、ER、AR、GR、MRなどの核内受容体（蛋白質 核酸 酵素 Vol.41 No.8 p1265-1272(1996)）が好適に用いられる。但し、本発明に用いられる

核内受容体はこれら例示した核内受容体に制限されるものではない。

本発明においては、これら核内受容体の遺伝子をそのまま用いることも可能であるが、核内受容体のDNA結合ドメインと他の核内受容体のリガンド結合ドメインとを含む融合蛋白質の遺伝子を用いることも可能である。例えば、DNA結合ドメインとしては、下流のレポーター遺伝子の発現を高めるため、GAL4のDNA結合ドメインなどが好適に用いられる。

また、第二発現ユニットにおける「核内受容体の結合配列」としては、核内受容体の種類に応じて変動するが、多くの核内受容体においては、通常「AGGTCA」を含む配列が用いられる。2量体を形成する核内受容体においては、この配列は2回の繰り返し配列であることが好ましい。繰り返し配列としては、核内受容体の種類に応じて配列が同方向に並んだダイレトリビート型や配列が中心方向に向かうパリンドローム型などが挙げられる（蛋白質 核酸 酵素 Vol.41 No.8 p1265-1272(1996)）。この繰り返しの間には通常スペーサー配列が存在し、これにより核内受容体の特異性を決定し得る（K.Umesono et al, Cell Vol.65 p1255-1266(1991)）。

また、核内受容体の結合配列の下流の「レポーター遺伝子」としては、特に制限はないが、好適なレポーター遺伝子としては、例えば、lacZ、CAT、ルシフェラーゼが挙げられる。その他、毒物や抗生物質に対する耐性遺伝子、例えば、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子などを用い、細胞にこれら遺伝子に対応する毒物や抗生物質を添加して細胞を選抜することも可能である。

なお、核内受容体の結合配列とレポーター遺伝子は直結している必要はなく、その間に、プロモーターの強度を改変する配列（例えば、 β -グロビンのプロモーター領域）などが挿入されていてもよい。

これら発現ユニットが導入される細胞としては、動物細胞が好ましい。特に、形質転換効率の高いCOS-1細胞やHeLa細胞が好適である。発現ユニットを構成する

ベクターとしては、動物細胞用のベクターが好ましく、例えば「pcDNA3」(invitrogen社製)が挙げられる。ベクターの宿主細胞への導入は、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法など当業者に公知の方法により行うことが可能である。

これにより調製された細胞に被検遺伝子が導入される。被検遺伝子としては、特に制限はなく、リガンドの前駆体をリガンドへ変換させる能力を検出したい所望の遺伝子を用いることが可能である。遺伝子のスクリーニングを行う場合には、目的の遺伝子を発現していることが予想される細胞、組織などから単離したmRNAを基に調製したcDNAライブラリーなどが用いられる。例えば、ビタミンD前駆体を活性型ビタミンDへ変換するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニングの場合には、腎臓由来のcDNAライブラリーなどが用いられる。なお、ビタミンD前駆体を活性型ビタミンDへ変換するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニングの場合には、効率よく活性型ビタミンDが生成するようにアドレノドキシン(ADX)の発現ベクターおよびアドレノドキシン還元酵素(ADR)の発現ベクターを被検遺伝子と共に導入すると好ましい。被検遺伝子は、適当な発現ベクターに挿入して細胞に導入しうる。ベクターとしては、例えば、上記した「pcDNA3」(invitrogen社製)などが好適である。

次いで、被検遺伝子が導入された細胞にリガンドの前駆体を作用させる。リガンドの前駆体としては、通常、上記第一発現ユニットにより発現する核内受容体に作用するリガンドの前駆体を用いる。リガンドの前駆体の具体例を示せば、VD_Rのリガンド(活性型ビタミンD($1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$))の前駆体である25-ヒドロキシビタミンD₃、ERのリガンド(エストロゲン)およびARのリガンド(ジヒドロキステストステロン)の前駆体であるテストステロン、GRのリガンド(コルチゾール)の前駆体である11デオキシコルチゾール、MRのリガンド(アルドステロン)の前駆体であるコルチコステロンなどが挙げられるが、これらに制限されない。細胞へのリガンドの前駆体の作用は、細胞を培養している培地にリガンドを添加

するなどの方法で行うことが可能である。

次いで、レポーターの活性を検出する。導入した被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードしていれば、添加したリガンドの前駆体からリガンドが生成し、これが核内受容体に結合し、形成されたリガンドと核内受容体との複合体がその標的配列に結合してレポーター遺伝子を発現させる。一方、導入した被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードしていなければ、リガンドの前駆体からリガンドが生成されないため、レポーター遺伝子は発現しない。このため、レポーター活性の検出により細胞へ導入した被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードしているか否かを判断することが可能である。なお、レポーター活性の検出は、レポーター遺伝子の種類に応じ、染色、蛍光、細胞の生死などを指標に当業者に公知の方法で行うことができる。

被検遺伝子として、単一の遺伝子ではなく、遺伝子のライブラリーなどを用いた場合には、次いで、レポーター活性が検出された細胞を選択し、該細胞から被検遺伝子を単離する。細胞からの被検遺伝子の抽出は、例えば、文献「H.S.Tong et al. Journal of Bone and Mineral Research Vol.9, 577-584(1994)」に記載の方法より行うことができる。抽出した遺伝子は、例えば、ジデオキシ法など公知の方法によりその一次構造を決定することが可能である。

第一発現ユニットと第二発現ユニットが導入された細胞は、リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニングや被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かの検査に利用する以外にも、例えば、核内受容体に結合するリガンドのスクリーニングや被検化合物が核内受容体に結合するリガンドであるか否かの検査に応用することが可能である。即ち、上記細胞に、リガンドの前駆体および該前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子の候補（単一の候補遺伝子や遺伝子ライブラリーなど）に代えて、例えば、核内受容体に作用する

リガンドの候補（単一の被検化合物や被検化合物のライブラリー）を用いれば、被検化合物がリガンドとして機能した場合に、核内受容体と被検化合物（リガンド）との複合体がその標的配列の下流のレポーターを活性化するため、被検化合物がリガンドとして機能する化合物であるか否かを簡便に検出することが可能であり、またレポーターの活性化を指標に複数の被検化合物の中からリガンドとして機能する化合物をスクリーニングすることも可能である。

本発明者等は、上記のリガンドの前駆体をリガンドへ変換する酵素をコードする遺伝子のスクリーニングの一例として、ビタミンDの前駆体を活性型ビタミンDへ変換するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニングを行い、目的の遺伝子を得た。本発明は、また、これにより得られたビタミンDの前駆体を活性型ビタミンDへ変換するタンパク質およびその遺伝子に関する。

本発明のタンパク質に含まれる、ビタミンDの前駆体を活性型ビタミンDへ変換するマウスおよびヒト由来のタンパク質をそれぞれ配列番号：1と配列番号：2に示す。ビタミンDは、最初に肝臓で水酸化されて $25(\text{OH})\text{D}_3$ が生じ、続いて腎臓で水酸化されて $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が生じるが、本発明のタンパク質は、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ を水酸化して $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に変換するタンパク質、即ち、ビタミンDの 1α 位を水酸化するタンパク質（ $1\alpha(\text{OH})$ アーゼ）である。

本発明のタンパク質は、天然のタンパク質の他、遺伝子組み換え技術を利用した組み換えタンパク質として調製することも可能である。本発明のタンパク質にはこれら双方のタンパク質が含まれる。天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば、後述の本発明のタンパク質に結合する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより腎臓細胞の抽出液などから単離することが可能である。一方、組み換えタンパク質であれば、後述するように本発明のタンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。

また、当業者であれば、公知の方法を用いて配列番号：1（または配列番号：

2) に記載のタンパク質中のアミノ酸を適宜置換などを行い、これと実質的に同等の生物学的活性を有するタンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加などにより配列番号：1（または配列番号：2）に記載のタンパク質に対してアミノ酸配列が改変された改変体であって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、文献「新細胞工学実験プロトコル 東京大学医科学研究所 制癌研究部編 p241-248」に記載の方法が挙げられる。また、市販の「QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit」（stratagene社製）を利用して変異を導入することも可能である。

また、当業者にとっては、周知技術であるハイブリダイゼーション技術（K. Ebihara et al. Molecular and Cellular Biology, Vol. 9, 577-584 (1994)）やポリメラーゼ連鎖反応技術（S. Kitanaka et al. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol. 82, 4054-4058 (1997)）などを用いて、マウス由来のタンパク質をコードする配列番号：3（またはヒト由来のタンパク質をコードする配列番号：4）に記載のDNA配列またはその一部を基に調製したプローブを利用して、他の生物からこれと相溶性の高いDNAを単離して、該DNAから本発明のタンパク質と実質的に同等の活性を有するタンパク質を得ることも常套手段である。従って、配列番号：3（または配列番号：4）に記載のDNA配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質も本発明のタンパク質に含まれる。ハイブリダイズするDNAを単離する他の生物としては、例えば、ラットやサルなどが挙げられる。なお、配列番号：1（または配列番号：2）に記載のタンパク質と実質的に同等の生物学的活性を有するタンパク質をコードするDNAは、通常、配列番号：3（または配列番号：4）に記載のDNAと高い相溶性を有する。高い相溶性とは、少なくとも70%以上、好ましくは少なくとも80%以上、さらに好ましくは少なく

とも90%以上の配列の同一性を指す。配列の相同性は、例えば、文献(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726,1983)に記載の方法により算出することができる。このような高い相同性を有するDNAを単離するための具体的な方法の一例を示せば、以下の如くである。配列番号：3(またはヒト由来のタンパク質をコードする配列番号：4)に記載のDNA配列を鋳型として³²Pで放射標識し、目的とした種のcDNAライブラリーよりスクリーニングする。ハイブリダイズの条件としては、通常、10%ホルムアミド、5xSSPE、1xデンハルト溶液、1xサケ精子DNAの条件で行う。好ましい条件としては、25%ホルムアミド、5xSSPE、1xデンハルト溶液、1xサケ精子DNAの条件であり、さらに好ましい条件としては、50%ホルムアミド、5xSSPE、1xデンハルト溶液、1xサケ精子DNAの条件である。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、cDNAでも、ゲノムDNAでもよく、また合成DNAであってもよい。本発明のDNAは、上記した本発明のタンパク質と実質的に同様の活性を有するタンパク質を他の生物から単離するために用いられる他、本発明のタンパク質を組み換えタンパク質として生産するためにも利用しうる。即ち、本発明のタンパク質をコードするDNA(例えば、配列番号：3または配列番号：4に記載のDNA)を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させタンパク質を精製することにより本発明のタンパク質を組み換えタンパク質として調製することが可能である。

組み換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、大腸菌や動物細胞が挙げられる。細胞内で組み換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、大腸菌であればpGEX(ファルマシア社製)、pET(ノバーゲン社製)が好適に用いられ、動物細胞であればpcDNA3(インビトロゲン社製)が好適に用いられる。これらベクターの宿主細胞への導入は、例えば、熱ショックなど用いて行うことができる。得られた形質転換体からの組み換えタンパク質の精製は、例えば、pGEX(ファルマシア社製)を用いた場合にはグルタ

チオンセファロースアフィニティークロマトグラフィーにより、またpET（ノバゲン社製）を用いた場合にはニッケルアガロースアフィニティークロマトグラフィーにより容易に行うことができる。

また、当業者であれば、調製した本発明のタンパク質を用いてこれに結合する抗体を調製することも容易に行いうる。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であれば、本発明のタンパク質をウサギなどに注入し、硫酸沈殿によりIg画分を精製するなど公知の方法で調製することが可能である。また、モノクローナル抗体であれば、本発明のタンパク質で免疫されたマウスの脾細胞を用いて骨髓腫細胞とのハイブリドーマを調製し、培養液中に分泌されるモノクローナル抗体を得て、さらに腹腔内に注入して大量のモノクローナル抗体を得るなどの方法で調製することが可能である。

本発明のタンパク質、DNA、または抗体の具体的な応用例としては、以下が挙げられる。本発明のタンパク質やDNAは、例えば、 1α 水酸化酵素欠損症患者あるいは腎不全患者などの 1α 水酸化酵素の活性が低い患者の治療および／または診断に利用することも可能である。本発明者等はビタミンD依存症I型患者で本発明のDNAの変異、具体的には、P382S(CCTからTCTへの変異)、R335P(CGGからCCGへの変異)、G125E(GGAからGAAへの変異)、R107H(CGCからCACへの変異)を同定しており、これら患者の治療にも利用可能である。なお、これら患者の変異は、患者の末梢血白血球よりDNAを抽出し、各エクソンをイントロンに設定したプライマーを用いてPCRにて増幅した後、直接シーケンス法にて塩基配列を決定することにより同定することが可能である。本発明のDNAを遺伝子治療目的で利用する場合には、本発明のDNAは適当なベクターに組み込み、レトロウイルス法、リボソーム法、アデノウイルス法などを用いて、*in vivo*法や*ex vivo*法により体内に導入される。本発明のタンパク質は、上記以外にも、例えば、固定化酵素として用いて活性型ビタミンD誘導体の製造（ 1α 位に水酸基が存在しないビタミンDおよびビタミンD誘導体の、 1α 位の水酸化）に用いることも可能である。また、本発明の抗体は、本発明

のタンパク質の精製に用いられる他、ビタミンD過剰状態、肉芽腫性疾患、リンパ腫などの治療にも利用しうる。

本発明者らは、また、上記した核内受容体に結合するリガンドのスクリーニング系を応用することにより、広く転写調節因子において、その不活性型から活性型への変換を行うタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングすることが可能であることを見出した。従って、本発明は、また、不活性型転写調節因子から活性型転写調節因子への変換を行うタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニング方法に関する。

転写調節因子の活性型への変換の分子機構に関しては、いくつかの報告例がある。例えば、組織特異的因子であるNF κ Bの場合には、TPA処理前にはNF κ Bは、細胞質中でI κ Bと呼ばれる因子と結合しているが、処理後にはその因子が解離し、核内へ移行する。TPA処理で変化が起こることから、プロテインキナーゼCによるリン酸化がNF κ Bの活性型への変換に関与していることが予想されている。また、HSTFの場合にも、熱ショック前にはHSTFのリン酸化の程度が低く、熱ショック後にはリン酸化の程度が高くなるので、HSTFの活性型への変換にリン酸化が関係していると考えられている。また、AP1においてもリン酸化が活性型AP1への変換に関与していると考えられる。

GAL4の場合には、ガラクトース誘導前にはGAL80が結合しているため、GAL4は不活性型として存在しているが、ガラクトース誘導後はその複合体の解離が起こり、GAL4の活性型が出現する。また、グルココルチコイド受容体の場合には、ホルモン誘導前には、hsp90が結合しているが、誘導後にはその複合体の解離が起こり、グルココルチコイド受容体の活性型が出現する（実験医学 Vol17, No.4, 1989参照）。

本発明における「不活性型転写調節因子から活性型転写調節因子への変換を行うタンパク質」には、このように阻害因子の解離による転写調節因子の活性化や転写調節因子の質的变化（例えば、リン酸化など）による活性化において機能す

るタンパク質が含まれる。本発明における「不活性型転写調節因子」としては、例えば、上記した非リン酸化NF κ BとI κ Bとの複合体、非リン酸化HSTF、非リン酸化AP1が挙げられるが、これらに制限されない。

このスクリーニング方法においては、上記の「第一発現ユニット」として、核内受容体遺伝子に代えて、不活性型の転写調節因子をコードする遺伝子が導入されたベクターを、「第二発現ユニット」として該転写調節因子の結合配列の下流にレポーター遺伝子が接続されているベクターを構築し、これら二つの発現ユニットが導入された細胞を調製し、該細胞に被検遺伝子を導入する。この場合において、導入した被検遺伝子が不活性型転写調節因子から活性型転写調節因子への変換を行う活性を有すれば、まず、第一発現ユニットの発現産物である不活性型転写調節因子が活性型転写調節因子に変換され、次いで該活性型転写調節因子が第二発現ユニットにおけるその結合配列に結合してレポーター遺伝子の発現を誘導する。一方、導入した被検遺伝子が不活性型転写調節因子から活性型転写調節因子への変換を行う活性を有しなければ、第二発現ユニットにおけるレポーター遺伝子の発現は誘導されない。従って、このスクリーニング方法によれば、レポーター活性を指標に被検遺伝子が不活性型転写調節因子から活性型転写調節因子への変換を行う活性を有するか否かを判定できる。このため、例えば、被検遺伝子として、遺伝子ライブラリーを用いれば、該ライブラリー中から、不活性型転写調節因子から活性型転写調節因子への変換を行う活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を単離することが可能である。

図面の簡単な説明

図1は、VDRを介した発現クローニング系の概略を示す図である。

図2は、3週目及び7週目のVDR+/+マウス、VDR+/-マウス、VDR-/-マウスの1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ の血清濃度を示すグラフである。

図3は、細胞のX-gal染色を示す顕微鏡写真である。(b)は発現cDNAライブラ

リーを形質転換したCOS-1細胞、(a)はネガティブコントロール、(c)はポジティブコントロールを示し、(d)は(b)における陽性細胞から抽出したcDNAをPCRにより増幅させ、再度染色した結果を示す。

図4は、CYP1ADの推定アミノ酸配列を示す図である。最初のメチオニンを1位として番号を付した。末端コドンはアステリクスによって示した。推定されるミトコンドリア標的シグナルを四角で囲った。ステロール結合ドメインに下線を引いた。ヘム結合ドメインは点線の下線で示した。

図5は、「CYP1AD」と、ラット25(OH)アーゼ(CYP27)及びマウス24(OH)アーゼ(CYP24)との相同性を示す図である。ステロール結合ドメイン及びヘム結合ドメインのアミノ酸配列の相同性も示されている。

図6は、インビトロで翻訳された「CYP1AD」蛋白質を、10%SDS-PAGEにより解析した電気泳動写真である。

図7は、「CYP1AD」のインビボにおける活性を検出するためのCATアッセイの結果を示す図である。1つの代表的なCATアッセイを下図に示し、CAT比活性を、3つの独立した実験についての平均値およびSEMとして上図に示す。

図8は、25(OH) D_3 代謝物の順相HPLC解析を示す図である。

図9は、25(OH) D_3 代謝物の逆相HPLC解析を示す図である。

図10は、「CYP1AD」転写産物の組織分布を解析するためのノーザンブロットを示す図である。

図11は、過剰量の1 α ,25(OH) $_2D_3$ を投与した(50ng/匹)(+)、または投与していない(-)、3週目及び7週目のVDR+/+マウス、VDR+/-マウス、VDR-/-マウスで行ったノーザンブロットを示す図である。

図12は、過剰量の1 α ,25(OH) $_2D_3$ を投与した(50ng/匹)(+)、または投与していない(-)、3週目及び7週目のVDR+/+マウス、vdr+/-マウス、VDR-/-マウスにおける、水酸化酵素遺伝子の相対量を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例1〕 ビタミンDの 1α 位を水酸化する酵素をコードするcDNAの単離

$1\alpha(\text{OH})$ アーゼをコードする全長cDNAをクローン化するために、本発明者らは核受容体を介した発現クローニング系を開発した。この系は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の前駆体である $25(\text{OH})\text{D}_3$ が、 $1\alpha(\text{OH})$ アーゼ活性が存在する場合だけVDRのトランス活性化機能を活性化しうることを基礎としている(図1)。すなわち、VDR(AF-2)のリガンド依存性トランス活性化機能は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によって誘導されるが、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ によっては誘導されない。 $1\alpha(\text{OH})$ アーゼが発現している細胞でのみ、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ が $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ へと転化されるため、該細胞は、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ の存在下でlacZレポーター遺伝子が発現する結果としてX-gal染色(M.A.Frederick et al., Current Protocols in Molecular biology(Wiley, New York, 1995))によって検出することができる。

7週目のVDR欠失マウス(VDR-/-マウス)の腎臓では、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の血清濃度が著しく高く(図2)、 $1\alpha(\text{OH})$ アーゼ活性が高いと考えられるため、7週目のVDR-/-マウスの腎臓を発現ライブラリーの調製に用いた。ポリ(A)⁺RNAを精製し(K. Takeyama et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 222, 395 (1996); H. Mano et al., J. Biol. Chem. 269, 1591 (1994))、それを用いて全cDNAを調製した(U. Gubler and B. J. Hoffmann, Gene 25, 263 (1983); M. Kobori and H. Nojima, Nucleic Acid Res. 21, 2782 (1993))。全cDNAを、SV40を起源とするCOS-1細胞内で自律複製できる哺乳動物発現ベクター、pcDNA3(invitrogen社製)のHindIII部位に挿入した。酵母のGAL4(UAS)x2及び β -グロブリンプロモーターをBasic発現ベクター(Clontech社製)のマルチクローニングサイトに挿入することによって、レポータープラスミド17M2-G-lacZを構築した。GAL4 DNA結合ドメインと融合したVDRリガンド結合ドメイン(VDR-DEF)[GAL4-VDR(DEF)](K. Ebihara et al.

l., Mol. Cell. Biol. 16, 3393 (1996); T. Imai et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 233, 765 (1997))を用いて、リガンドにより誘導されるAF-2の機能を検出した。10%の胎児牛血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で培養したCOS-1細胞に、0.5 μ gのGAL4-VDR(DEF)発現ベクター、1 μ gの17M2-G-lacZ、それぞれ0.2 μ gのADX発現ベクター及びADR発現ベクター(T. Sakaki, S. Kominami, K. Hayashi, M. Aklyoshi Shibata, Y. Yabusaki, J. Biol. Chem. 271, 26209 (1996); F. J. Dilworth et al., J. Biol. Chem. 270, 16766 (1995))、0.1 μ gの発現cDNAライブラリーを、リポフェクチン試薬(GIBCO BRL社製)を用いて、一時的に形質転換した。形質転換から12時間後、 10^{-8} Mの25(OH) D_3 を培地に添加し、形質転換から48時間後、細胞を0.05%のグルタルアルデヒドで固定し、X-galと共に37°Cで4時間インキュベートすることにより、 1α (OH)アーゼ活性の発現を示す β -ガラクトシダーゼに陽性な細胞をX-gal染色によって同定した(図3(c)) (M. A. Frederick et al., Current Protocols in Molecular Biology (Wiley, New York, 1995)参照)。なお、ネガティブコントロールでは、発現cDNAライブラリーを省略し(図3(a))、ポジティブコントロールでは、発現ライブラリーを省略し、さらに25(OH) D_3 の代わりに $1\alpha, 25$ (OH) $_2D_3$ を添加した(図3(b))。

染色された細胞を、直径40 μ mのマикроピペットを用いて倒立顕微鏡下でマイクロマニピュレーションによって選択的に集め(H. S. Tong et al., J. Bone Miner. Res. 9, 577 (1994)参照)、PCR用の反応緩衝液に移した。PCR産物を1%アガロースゲル上で泳動させ、2.0から2.5kb付近のフラグメント(予想される全長 1α (OH)アーゼcDNAの大きさ)を精製し、pcDNA3内にサブクローン化した。ランダムな64クローンから単離したcDNAの配列解析で、13クローンが同一の完全なORFをコードすることが示された。この単一なcDNAクローンを再導入したCOS-1細胞は、X-gal染色に陽性であった(図3(d))。

このcDNAをプローブとして用いた、同一ライブラリーのコロニーハイブリダイゼーションスクリーニングによって、全長cDNAが得られた。ORFから推定されるア

ミノ酸配列は、507アミノ酸からなる新規な蛋白質を構成している(図4)。

このタンパク質(以後、「CYP1AD」と呼ぶ)は、ミトコンドリア標的シグナルを有し、さらに、P450ファミリーのメンバーと有意な相同性を示す(D. W. Nebert, DNA Cell Biol.10, 1 (1991)参照)。特に、ラットのビタミンD₃25-水酸化酵素との相同性は、41.7%であり、マウスの25(OH)D₃24-水酸化酵素との相同性は、31.6%である(図5)(O. Masumoto, Y Ohyama, K. Okuda, J. Biol. Chem. 263, 14256 (1988); E. Usui, M. Noshiro, Y. Ohyama, K. Okuda, FEBS Lett.262, 367 (1990); Y. Ohyama and K. Okuda, J.Biol. Chem. 266, 8690 (1991); S. Itoh et al., Biochem. Biophys. Acta.1264, 26 (1995)参照)。特によく保存されたドメイン、ステロール結合ドメインの相同性はそれぞれ93%、60%であり、ヘム結合ドメインの相同性はそれぞれ70%、80%である。

網状赤血球溶解系(Promega社製)を用いて[³⁵S]メチオニンの存在下でインビトロ翻訳させた「CYP1AD」蛋白質を、10%SDS-PAGEにより解析したところ(H. Sasaki et al., Biochemistry 34, 370 (1995)参照)、その分子量は、およそ55kDaであり(図6)、部分精製された1 α (OH)アーゼの分子量と一致していた(S. Wakinoh et al, Gerontology 42, 67 (1996); Eva Axen, FEBS lett 375, 277 (1995); M. Burgos-Trinidad, R. Ismail, R. A. Ettinger, J. M. Prahl, H. F. DeLuca, J. Biol. Chem. 267, 3498 (1992); M. Warner et al., J. Biol. Chem. 257, 12995 (1982)参照)。

[実施例2] 「CYP1AD」のインビボにおける活性の検出

「CYP1AD」が、インビボで、25(OH)D₃を活性型ビタミンDに転化することによって、VDRのトランス活性化機能を活性化する能力を持つことを確かめるために、0.5 μ gのGAL4-VDR(DEF)発現ベクター、1 μ gの17M2-G-CAT(S.Kato et al., Science 270, 1491(1995))、それぞれ0.5 μ gのADX発現ベクター、ADR発現ベクター(T. Sakaki, S. Kominami, K. Hayashi, M. Akiyoshi-Shibata, Y. Yabusaki, J. Biol. Chem. 271, 26209 (1996); F. J. Dilworth et al., J. Biol. Chem. 270, 167

66 (1995)), $1\mu\text{g}$ のCYP1AD発現ベクターを、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ または $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の存在下で、COS-1細胞に同時形質転換した。1つの代表的なCATアッセイを図7の下図に示す。また、CAT比活性を、3つの独立した実験についての平均値およびSEMとして図7の上図に示す。「CYP1AD」発現ベクターを用いない場合は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のみが、CATレポーター遺伝子を活性化したが、「CYP1AD」を発現させた場合には、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ がレポーター遺伝子を活性化することができた。しかしながら、ADX又はADRの非存在下では、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ による有意な活性化が見られなかった。これらの結果から、「CYP1AD」が $25(\text{OH})\text{D}_3$ を $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に転化する $1\alpha(\text{OH})$ アーゼであることが強く示唆される。

【実施例3】 「CYP1AD」の生成物の化学的分析

「CYP1AD」による酵素生成物を化学的に決定するために、順相HPLC及び逆相HPLCを行った(E. B. Mawer et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 79, 554 (1994); H. Fujii et al., EMBOJ, in press, (1997)参照)。 $[^3\text{H}]25(\text{OH})\text{D}_3$ (10^5dpm ; 6.66テラベクレル/ μmol 、Amersham International)を、ADR発現ベクター及びARX発現ベクターと、CYP1AD発現ベクターを形質転換した(図8(b))または形質転換していない(図8(c))細胞(5×10^6)と共に、 37°C で6時間インキュベートした。培養した培地をクロロホルムで抽出し、移動相としてヘキサン/イソプロパノール/メタノール(88:6:6)を用いたTSKゲルシリカ150カラム($4.6\times 250\text{mm}$ 、トソー)による順相HPLCで、流速 1.0ml/分 で分析した。溶離した画分を集め、その放射能を液体シンチレーションカウンターによって計測した(E. B. Mawer et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 79, 554 (1994); H. Fujii et al., EMBOJ, in press, (1997))。標品のビタミンD誘導体 $[1\alpha, (\text{OH})\text{D}_3$ 、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 、 $24, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 及び $1\alpha, 24, 25(\text{OH})_3\text{D}_3]$ をクロマトグラフィーにかけ、これらビタミンD誘導体のリテンションタイムを 264nm のUV吸収により決定した(図8(a))。

上記の順相HPLCと同様にして、逆相HPLCを行った。「Cosmasil 5C18-AR」を充填したカラム($4.6\times 150\text{mm}$ 、ナカライテスク社)を用いて、移動相の流速 1.0ml/分 で、

[^3H]1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ の存在を確かめた。標品のビタミンD誘導体を図9(a)に、「CYP1AD」の存在下または非存在下での反応生成物のクロマトグラムを、それぞれ図9(b)、図9(c)に示す。

酵素生成物の、順相HPLC及び逆相HPLCにおけるリテンションタイムは、標品の1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ のリテンションタイムと完全に一致した。このことから、「CYP1AD」のcDNAは、25(OH)D $_3$ を1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ に水酸化するマウスの1 α (OH)アーゼをコードすることが立証された。

【実施例4】 「CYP1AD」転写産物の組織分布の解析

7週目の正常マウス及びVDR-/-マウスの「CYP1AD」転写産物の組織分布について調査した。脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、小腸、骨格筋、皮膚、骨由来のポリ(A) $^+$ RNAを抽出し、プローブとして「1CYP1AD」及び β -アクチンのcDNAを用いたノーザンブロットにより解析した(K. Takeyama et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 222, 395 (1996); H. Mano et al., J. Biol. Chem. 269, 1591 (1994))。その結果、「CYP1AD」の転写産物は腎臓に単一のバンドとして検出され、その転写産物の大きさ(2.4kbp)はクローン化されたcDNAの大きさと一致した(図10)。腎以外のいくつかの組織で1 α (OH)アーゼ活性が報告されているが(A. W. Norman, J. Roth, L. Orchi, Endocr Rev. 3, 331 (1982); H. F. DeLuca, Adv Exp Med Biol. 196, 361 (1986); M. R. Walters, Endocr Rev. 13, 719 (1992); G. A. Howard, R. T. Turner, D. J. Sherrard, D. J. Baylink, J. Biol. Chem. 256, 7738 (1981); T. K. Gray, G. E. Lester, R. S. Lorenc, Science 204, 1311 (1979))、1 α (OH)アーゼの転写産物は腎以外の組織では検出レベルになかった。

「CYP1AD」遺伝子及び24(OH)アーゼ(CYP24)遺伝子の発現のノーザンブロット解析を、過剰量の1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ を投与した(50ng/匹)(+)、または投与していない(-)、3週目及び7週目のVDR+/+マウス、VDR+/-マウス、VDR-/-マウスで行った。代表的なノーザンブロット解析を図11に示した。1グループ5匹以上のマウスの、

β -アクチン転写産物で標準化した水酸化酵素遺伝子の相対量を計測した(図12)。興味深いことに、VDR^{-/-}マウス(3及び7週齢)で、この遺伝子の著しい誘導が見られた(3週目のマウスではおよそ2.5倍、7週目のマウスでは50倍)(図11及び図12)。1 α ,25(OH)₂D₃の投与によってVDR^{+/+}マウス及びVDR^{+/-}マウスでは1 α (OH)アーゼ遺伝子発現が有意に抑制されたが、3週目及び7週目のVDR^{-/-}マウス内では抑制されなかった。従って、7週目のVDR^{-/-}マウスの血清の1 α ,25(OH)₂D₃レベルが通常よりも高いことは(図2)、1 α (OH)アーゼの過剰発現のためであるらしい。これらの結果を考え合わせると、リガンドが結合したVDRが、1 α ,25(OH)₂D₃による1 α (OH)アーゼ遺伝子の発現の負の調節に関連していることが考えられる。VDR^{-/-}マウスでは、24(OH)アーゼ遺伝子の発現は、検出不可能なレベルまで低下し、1 α ,25(OH)₂D₃に対する反応は見られなかった(図11及び12)。24(OH)アーゼ遺伝子は、ビタミンDの不活性型である24,25(OH)₂D₃に25(OH)D₃を転化するものであり、その遺伝子発現は1 α ,25(OH)₂D₃によって正に調節されている。これらの結果から、リガンドが結合したVDRが、24(OH)アーゼ遺伝子のプロモーター内のビタミンD応答エレメントを通じて1 α ,25(OH)₂D₃が誘導する遺伝子の発現に関わっていることが確認された(C. Zierold, H. M. Darwish, H. F. DeLuca, J. Biol. Chem. 270, 1675 (1995); Y. Ohyama et al., J. Biol. Chem. 269, 10545 (1994))。これらの結果は、リガンドが結合したVDRが、1 α ,25(OH)₂D₃による1 α (OH)アーゼ及び24(OH)アーゼの遺伝子発現の調節に反対の方法で関わっていることを示している。

〔実施例5〕 ビタミンDの1 α 位を水酸化する酵素をコードするヒト遺伝子の単離

マウス1 α 水酸化酵素のSacII(500bp)-EcoRI(1200bp)断片をプローブとし、ヒト正常腎組織よりpolyA RNAを抽出して、ラムダZAPIIに組み込んで作製した正常ヒト腎臓cDNAライブラリーのブランクハイブリダイゼーション法によるスクリーニングにてビタミンDの1 α 位を水酸化する酵素をコードするヒト遺伝子を取得した。単離した遺伝子の塩基配列を配列番号：4に、推定アミノ酸配列を配列番号：2

に示す。

産業上の利用の可能性

本発明により、リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法、および被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法が提供された。本発明の方法は、従来の発現クローニング法と異なり、リガンドとの結合により転写調節を行う核内受容体の性質を巧みに利用した方法であり、レポーター活性を指標に、目的の遺伝子か否かを検出できるため、例えば、極めて発現量の低いタンパク質をコードする遺伝子でも簡便かつ効率的に検出し、単離することが可能である。また、本発明により、上記スクリーニング方法を利用して、リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質、具体的には、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質およびその遺伝子が提供された。本発明のタンパク質およびその遺伝子は、1 α 水酸化酵素欠損症患者や腎不全患者の治療および／または予防などへの利用が期待される。また、本発明のタンパク質は、活性型ビタミンD誘導体の製造（1 α 位に水酸基が存在しないビタミンDおよびビタミンD誘導体の、1 α 位の水酸化）へも利用しうる。また、本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質の精製に用いられる他、ビタミンD過剰状態、肉芽腫性疾患、リンパ腫などの治療への利用も期待される。

また、本発明により核内受容体に結合するリガンドをスクリーニングする方法、および被検化合物が核内受容体のリガンドであるか否かを検査する方法が提供された。この方法も核内受容体の性質を利用し、レポーター活性を指標とするため、上記の方法と同様に簡便かつ効率的な方法であり、例えば、リガンドの存在が知られていないオーファン受容体のリガンドの検索などに有用である。

さらに、本発明により、上記のスクリーニング方法を応用した、不活性型転写調節因子を活性型転写調節因子に変換するタンパク質をコードする遺伝子をスク

リーニングする方法が提供された。この方法によれば、広く転写調節因子において、その不活性型から活性型への変換を行うタンパク質をコードする遺伝子を、レポーター活性を指標として、簡便に単離することが可能である。

請求の範囲

1. 核内受容体をコードする遺伝子を有するベクターおよび該核内受容体の結合配列の下流にレポーター遺伝子が接続されているベクターが導入された細胞。
2. 核内受容体がビタミンD受容体である、請求項1に記載の細胞。
3. 核内受容体のDNA結合ドメインと核内受容体のリガンド結合ドメインとを含む融合タンパク質をコードする遺伝子を有するベクターおよび該核内受容体のDNA結合ドメインの結合配列の下流にレポーター遺伝子が接続されているベクターが導入された細胞。
4. 核内受容体のDNA結合ドメインがGAL4に由来する、請求項3に記載の細胞。
5. 核内受容体のリガンド結合ドメインがビタミンD受容体に由来する、請求項3に記載の細胞。
6. 核内受容体に結合するリガンドをスクリーニングする方法であって、
 - (A) 請求項1乃至5のいずれかに記載の細胞に被検化合物を作用させる工程、
 - (B) レポーター活性を検出する工程、
 - (C) レポーター活性が検出された細胞に作用させた被検化合物を選択する工程、を含む方法。
7. 被検化合物が核内受容体に結合するリガンドであるか否かを検査する方法であって、
 - (A) 請求項1乃至5のいずれかに記載の細胞に被検化合物を作用させる工程、
 - (B) レポーター活性を検出する工程、を含む方法。
8. リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法であって、
 - (A) 請求項1乃至5のいずれかに記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、

(B) (A) の工程により被検遺伝子が導入された細胞にリガンドの前駆体を作用させる工程、

(C) レポーター活性を検出する工程、

(D) レポーター活性が検出された細胞から被検遺伝子を単離する工程、を含む方法。

9. 被検遺伝子が、リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法であって、

(A) 請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、

(B) (A) の工程により被検遺伝子が導入された細胞にリガンドの前駆体を作用させる工程、

(C) レポーター活性を検出する工程、

を含む方法。

10. 非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法であって、

(A) 請求項 2 または 5 に記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、

(B) (A) の工程により被検遺伝子が導入された細胞に非活性型ビタミンD₃を作用させる工程、

(C) レポーター活性を検出する工程、

(D) レポーター活性が検出された細胞から被検遺伝子を単離する工程、を含む方法。

11. 被検遺伝子が、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法であって、

(A) 請求項 2 または 5 に記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、

(B) (A) の工程により被検遺伝子が導入された細胞に非活性型ビタミンD₃を作用させる工程、

(C) レポーター活性を検出する工程、

を含む方法。

12. 請求項6に記載の方法により単離しうる、核内受容体に結合するリガンド。

13. 請求項8に記載の方法により単離しうる、リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子。

14. 請求項10に記載の方法により単離しうる、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換するタンパク質をコードする遺伝子。

15. 配列番号：1に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列からなり、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質。

16. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列からなり、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質。

17. 配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質。

18. 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質。

19. 請求項15乃至18のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA。

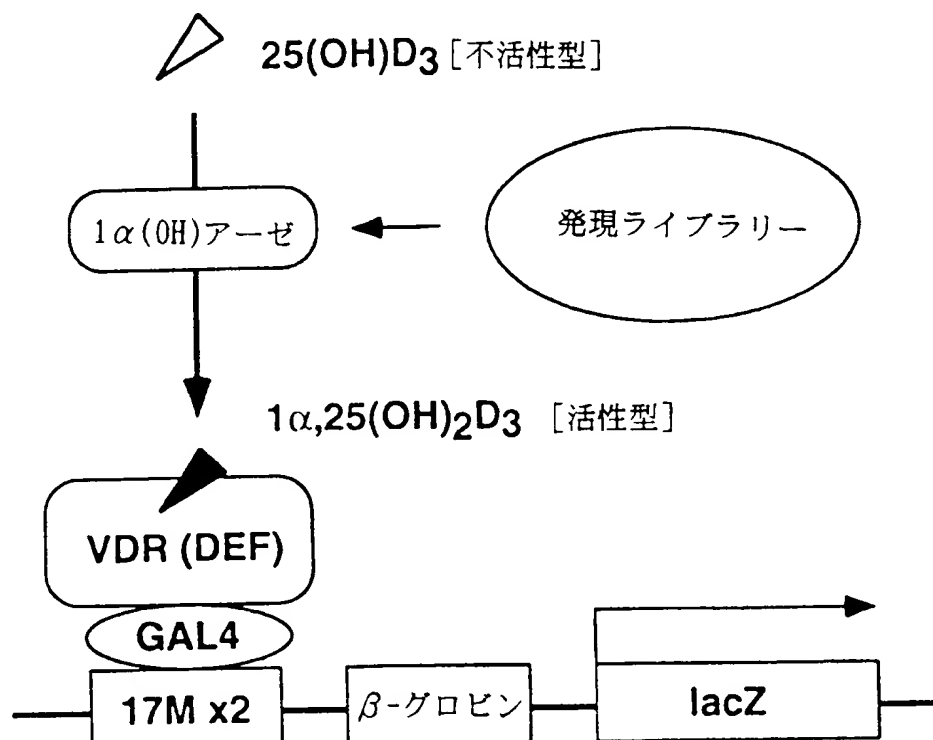
20. 配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

21. 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

22. 請求項19乃至21のいずれかに記載のDNAを含むベクター。
23. 請求項19乃至21のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。
24. 請求項23に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項15乃至18のいずれかに記載のタンパク質の生産方法。
25. 請求項15乃至18のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。
26. 不活性型転写調節因子を活性型転写調節因子に変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法であって、
- (A) 不活性型転写調節因子をコードする遺伝子を有するベクターおよび該不活性型転写調節因子の結合配列の下流にレポーター遺伝子が接続されているベクターが導入されている細胞に被検遺伝子を導入する工程、
- (B) レポーター活性を検出する工程、
- (C) レポーター活性が検出された細胞から被検遺伝子を単離する工程、
- を含む方法。
27. 不活性型転写調節因子が、非リン酸化NF κ BとI κ Bとの複合体、非リン酸化HSTF、または非リン酸化AP1である、請求項26に記載の方法。

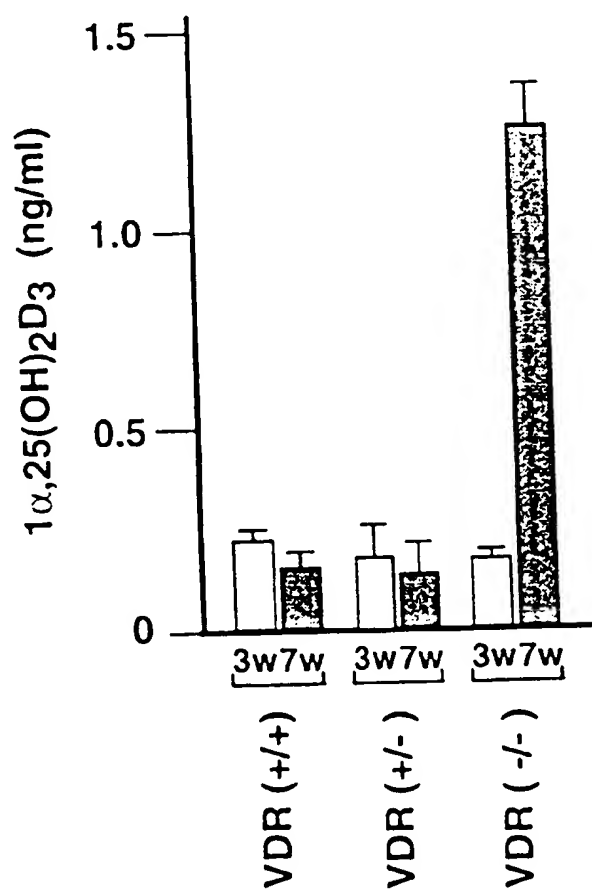
1 / 12

図 1



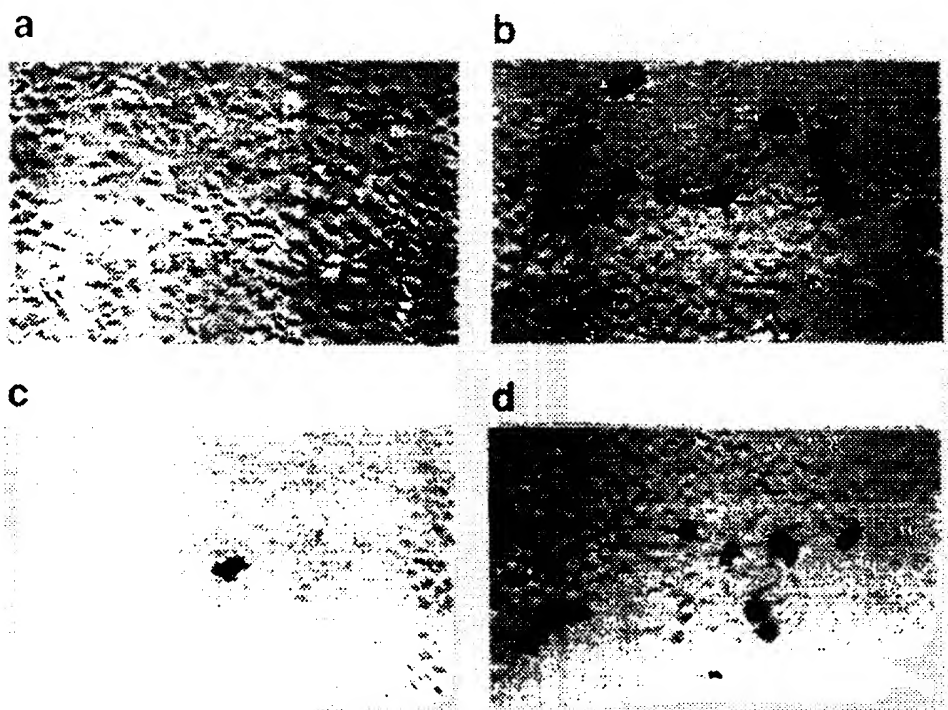
2 / 12

图 2



3/12

図 3



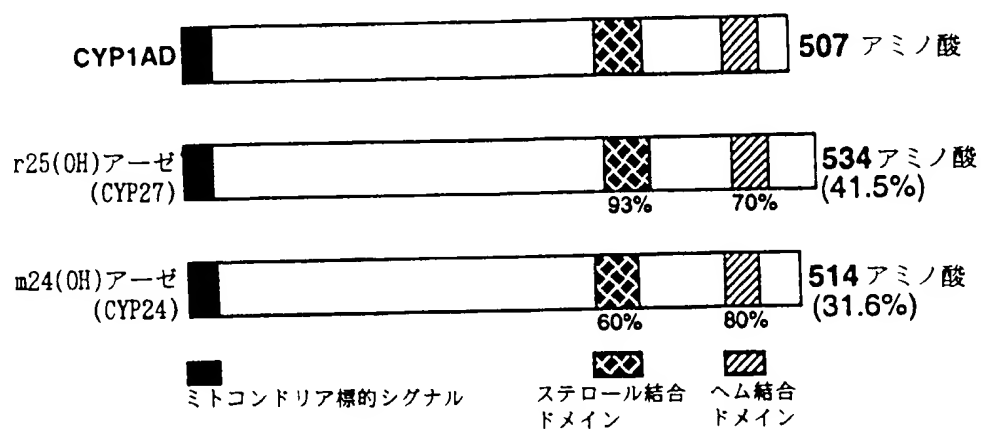
4 / 1 2

☒ 4

1	MTQAVKLASRVF	<u>HRIHLP</u>	QLDASLGSRGSESVLRSLSDI	40
41	PGPSTLSFLAELFCKGGLSRLHELQVHGAARYGPIWSGSF			80
81	GTLRTVYVADPTLVEQLLRQESHCPERCSFSSWAEHRRRH			120
121	QRACGLLTADGEEWQRLRSLLAPLLLRPQAAAGYAGTLDN			160
161	VVRDLVRRRLRRQRGRGSGLPGLVLDVAGEFYKFGLESIGA			200
201	VLLGSRLGCLAEVPPDTETFIHAVGSV FVSTLLTMAMPN			240
241	WLHHLIPGPWARLCRDWDQMFAFAQRHVELREGEAAMRNQ			280
281	GKPEEDMPSGHHLTHFLFREKVS VQSIVGNVTELLLAGVD			320
321	TVSNTLSWTLYELSRHPDVQTALHSEITAGTRGSCAHPHG			360
361	TALSQ L <u>PLLKAVIKEVLR</u> LYPVVPGNSRVPDRDIRVGN YV			400
401	IPQDTLVSLCHYATSRDPTQFPDPNSFNPARWLGE GTPH			440
441	PFASLP <u>FGE</u> <u>GKR</u> <u>SCIG</u> RRRLAELELQMALSQILTHFEVLPE			480
481	PGALPIKPMTRTVLVPERSINLQFVDR*			

5 / 12

図 5



6 / 12

図 6

(kDa)

210 —

120 —

84 —

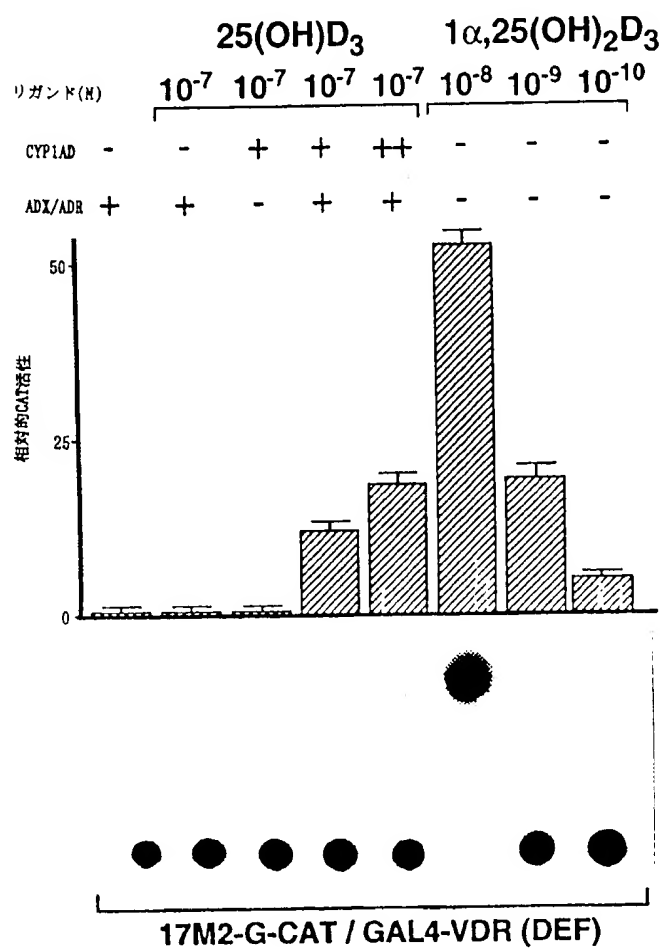
48 —

—

—

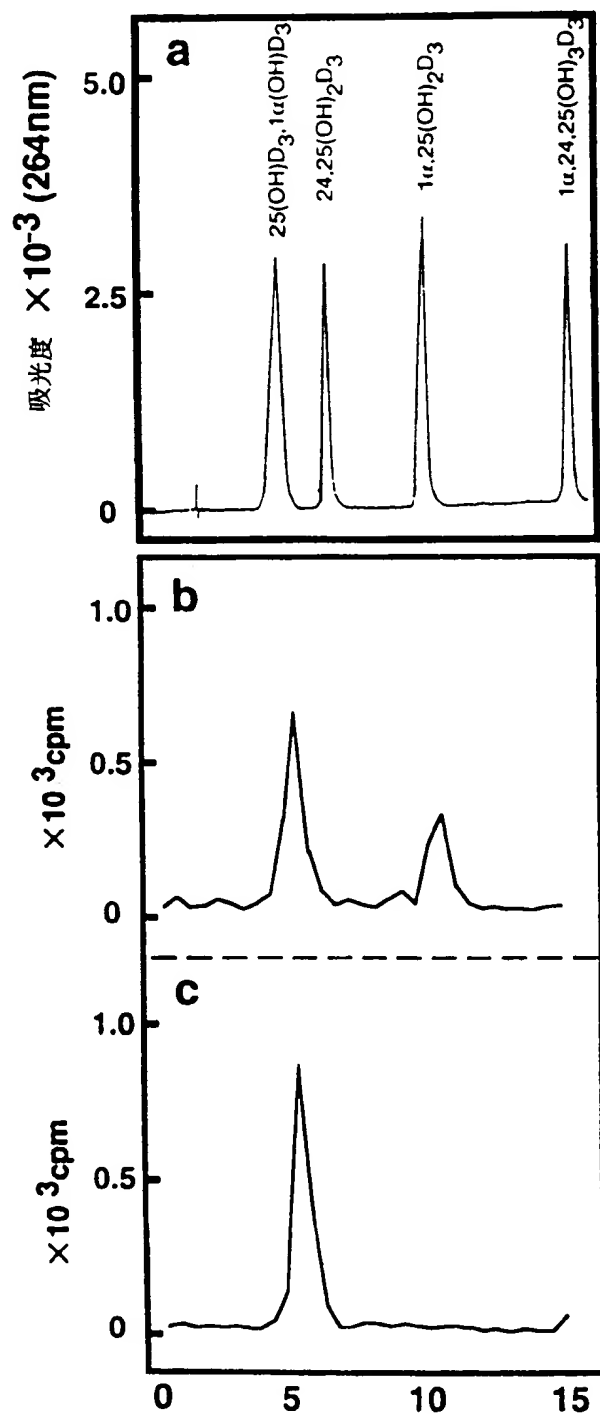
7/12

図 7



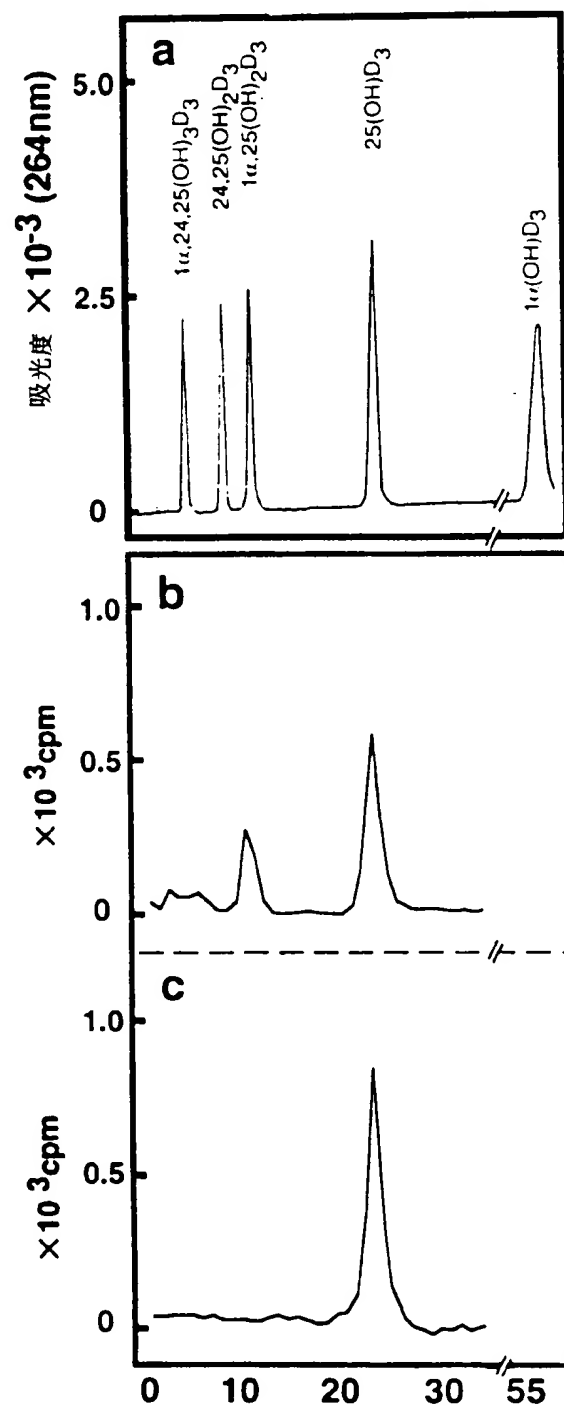
8 / 12

8



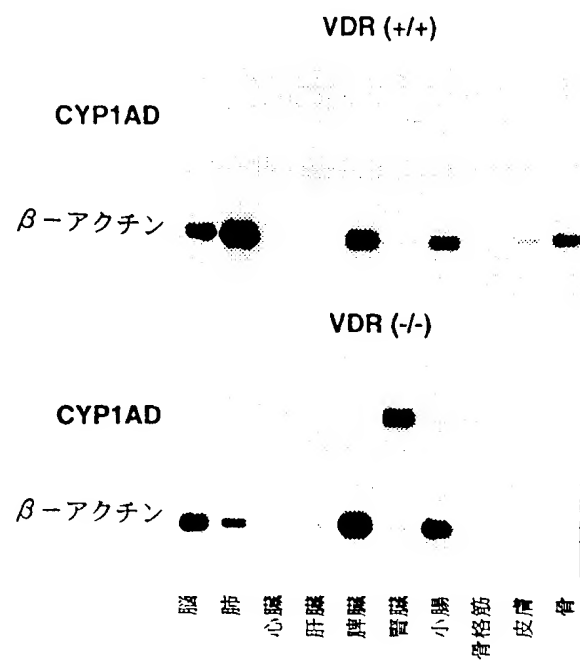
9 / 12

图 9



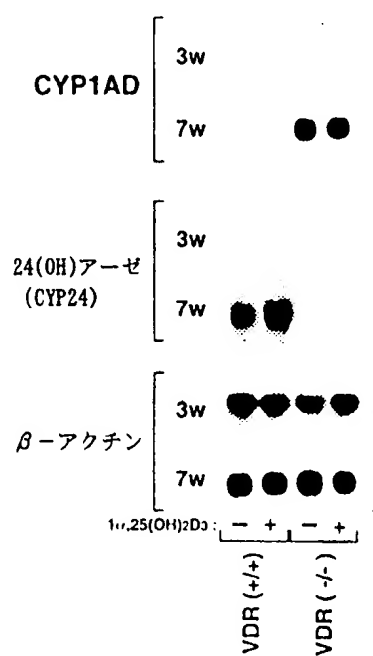
10/12

図10



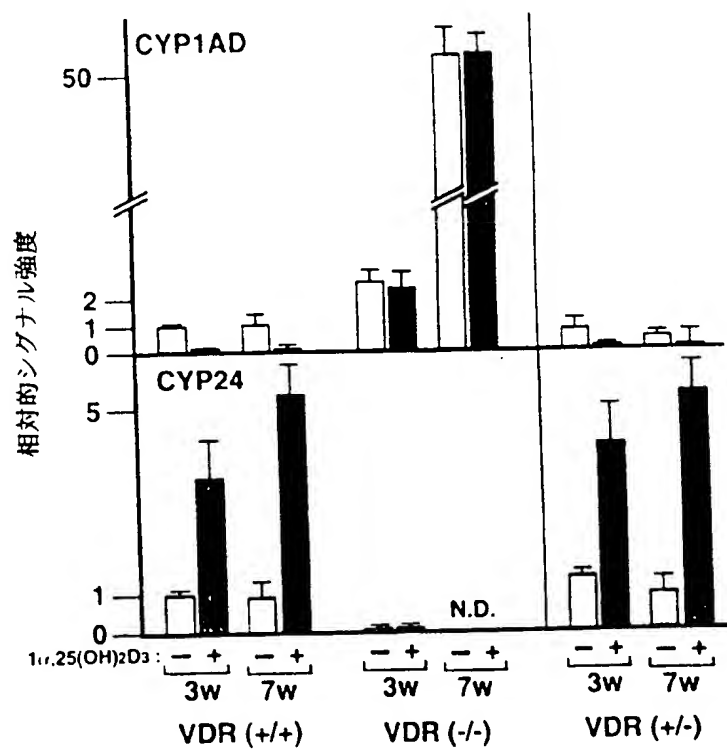
11/12

図 11



12/12

図 12



1/16

配列表

<110> CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Gene screening method using a nuclear receptor

<130> C1-901PCT

<140>

<141>

<150> JP 09/212624

<151> 1997-7-22

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 507

<212> RPT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Thr Gln Ala Val Lys Leu Ala

1

5

2/16

Ser Arg Val Phe His Arg Ile His Leu Pro Leu Gln Leu Asp Ala Ser
 10 15 20
 Leu Gly Ser Arg Gly Ser Glu Ser Val Leu Arg Ser Leu Ser Asp Ile
 25 30 35 40
 Pro Gly Pro Ser Thr Leu Ser Phe Leu Ala Glu Leu Phe Cys Lys Gly
 45 50 55
 Gly Leu Ser Arg Leu His Glu Leu Gln Val His Gly Ala Ala Arg Tyr
 60 65 70
 Gly Pro Ile Trp Ser Gly Ser Phe Gly Thr Leu Arg Thr Val Tyr Val
 75 80 85
 Ala Asp Pro Thr Leu Val Glu Gln Leu Leu Arg Gln Glu Ser His Cys
 90 95 100
 Pro Glu Arg Cys Ser Phe Ser Ser Trp Ala Glu His Arg Arg Arg His
 105 110 115 120
 Gln Arg Ala Cys Gly Leu Leu Thr Ala Asp Gly Glu Glu Trp Gln Arg
 125 130 135
 Leu Arg Ser Leu Leu Ala Pro Leu Leu Leu Arg Pro Gln Ala Ala Ala
 140 145 150
 Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Asp Asn Val Val Arg Asp Leu Val Arg Arg
 155 160 165
 Leu Arg Arg Gln Arg Gly Arg Gly Ser Gly Leu Pro Gly Leu Val Leu
 170 175 180
 Asp Val Ala Gly Glu Phe Tyr Lys Phe Gly Leu Glu Ser Ile Gly Ala
 185 190 195 200
 Val Leu Leu Gly Ser Arg Leu Gly Cys Leu Glu Ala Glu Val Pro Pro
 205 210 215

3/16

Asp Thr Glu Thr Phe Ile His Ala Val Gly Ser Val Phe Val Ser Thr
220 225 230

Leu Leu Thr Met Ala Met Pro Asn Trp Leu His His Leu Ile Pro Gly
235 240 245

Pro Trp Ala Arg Leu Cys Arg Asp Trp Asp Gln Met Phe Ala Phe Ala
250 255 260

Gln Arg His Val Glu Leu Arg Glu Gly Glu Ala Ala Met Arg Asn Gln
265 270 275 280

Gly Lys Pro Glu Glu Asp Met Pro Ser Gly His His Leu Thr His Phe
285 290 295

Leu Phe Arg Glu Lys Val Ser Val Gln Ser Ile Val Gly Asn Val Thr
300 305 310

Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp Thr Val Ser Asn Thr Leu Ser Trp
315 320 325

Thr Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His Pro Asp Val Gln Thr Ala Leu His
330 335 340

Ser Glu Ile Thr Ala Gly Thr Arg Gly Ser Cys Ala His Pro His Gly
345 350 355 360

Thr Ala Leu Ser Gln Leu Pro Leu Leu Lys Ala Val Ile Lys Glu Val
365 370 375

Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val Pro Gly Asn Ser Arg Val Pro Asp Arg
380 385 390

Asp Ile Arg Val Gly Asn Tyr Val Ile Pro Gln Asp Thr Leu Val Ser
395 400 405

Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser Arg Asp Pro Thr Gln Phe Pro Asp Pro
410 415 420

4/16

Asn Ser Phe Asn Pro Ala Arg Trp Leu Gly Glu Gly Pro Thr Pro His
 425 430 435 440
 Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe Gly Phe Gly Lys Arg Ser Cys Ile Gly
 445 450 455
 Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu Leu Gln Met Ala Leu Ser Gln Ile Leu
 460 465 470
 Thr His Phe Glu Val Leu Pro Glu Pro Gly Ala Leu Pro Ile Lys Pro
 475 480 485
 Met Thr Arg Thr Val Leu Val Pro Glu Arg Ser Ile Asn Leu Gln Phe
 490 495 500
 Val Asp Arg
 505

<210> 2

<211> 508

<212> RPT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Gln Thr Leu Lys Tyr Ala Ser Arg Val Phe His Arg Val Arg
 1 5 10 15
 Trp Ala Pro Glu Leu Gly Ala Ser Leu Gly Tyr Arg Glu Tyr His Ser
 20 25 30
 Ala Arg Arg Ser Leu Ala Asp Ile Pro Gly Pro Ser Thr Pro Ser Phe
 35 40 45
 Leu Ala Glu Leu Phe Cys Lys Gly Gly Leu Ser Arg Leu His Glu Leu

5/16

50	55	60	
Gln Val Gln Gly Ala Ala His Phe Gly Pro Val Trp Leu Ala Ser Phe			
65	70	75	80
Gly Thr Val Arg Thr Val Tyr Val Ala Ala Pro Ala Leu Val Glu Glu			
	85	90	95
Leu Leu Arg Gln Glu Gly Pro Arg Pro Glu Arg Cys Ser Phe Ser Pro			
	100	105	110
Trp Thr Glu His Arg Arg Cys Arg Gln Arg Ala Cys Gly Leu Leu Thr			
	115	120	125
Ala Glu Gly Glu Glu Trp Gln Arg Leu Arg Ser Leu Leu Ala Pro Leu			
	130	135	140
Leu Leu Arg Pro Gln Ala Ala Ala Arg Tyr Ala Gly Thr Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Val Val Cys Asp Leu Val Arg Arg Leu Arg Arg Gln Arg Gly Arg Gly			
	165	170	175
Thr Gly Pro Pro Ala Leu Val Arg Asp Val Ala Gly Glu Phe Tyr Lys			
	180	185	190
Phe Gly Leu Glu Gly Ile Ala Ala Val Leu Leu Gly Ser Arg Leu Gly			
	195	200	205
Cys Leu Glu Ala Gln Val Pro Pro Asp Thr Glu Thr Phe Ile Arg Ala			
	210	215	220
Val Gly Ser Val Phe Val Ser Thr Leu Leu Thr Met Ala Met Pro His			
225	230	235	240
Trp Leu Arg His Leu Val Pro Gly Pro Trp Gly Arg Leu Cys Arg Asp			
	245	250	255
Trp Asp Gln Met Phe Ala Phe Ala Gln Arg His Val Glu Arg Arg Glu			

6/16

260	265	270	
Ala Glu Ala Ala Met Arg Asn Gly Gly Gln Pro Glu Lys Asp Leu Glu			
275	280	285	
Ser Gly Ala His Leu Thr His Phe Leu Phe Arg Glu Glu Leu Pro Ala			
290	295	300	
Gln Ser Ile Leu Gly Asn Val Thr Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp			
305	310	315	320
Thr Val Ser Asn Thr Leu Ser Trp Ala Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His			
325	330	335	
Pro Glu Val Gln Thr Ala Leu His Ser Glu Ile Thr Ala Ala Leu Ser			
340	345	350	
Pro Gly Ser Ser Ala Tyr Pro Ser Ala Thr Val Leu Ser Gln Leu Pro			
355	360	365	
Leu Leu Lys Ala Val Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val			
370	375	380	
Pro Gly Asn Ser Arg Val Pro Asp Lys Asp Ile His Val Gly Asp Tyr			
385	390	395	400
Ile Ile Pro Lys Asn Thr Leu Val Thr Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser			
405	410	415	
Arg Asp Pro Ala Gln Phe Pro Glu Pro Asn Ser Phe Arg Pro Ala Arg			
420	425	430	
Trp Leu Gly Glu Gly Pro Thr Pro His Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe			
435	440	445	
Gly Phe Gly Lys Arg Ser Cys Met Gly Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu			
450	455	460	
Leu Gln Met Ala Leu Ala Gln Ile Leu Thr His Phe Glu Val Gln Pro			

7/16

465 470 475 480
Glu Pro Gly Ala Ala Pro Val Arg Pro Lys Thr Arg Thr Val Leu Val
 485 490 495
Pro Glu Arg Ser Ile Asn Leu Gln Phe Leu Asp Arg
 500 505

<210> 3

<211> 2386

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (30)...(1550)

<400> 3

ctctcgaagc agactcccca aacacagac atg acc cag gca gtc aag ctc gcc	53
Met Thr Gln Ala Val Lys Leu Ala	
1 5	
tcc aga gtt ttt cac cga atc cac ctg cct ctg cag ctg gat gcc tcg	101
Ser Arg Val Phe His Arg Ile His Leu Pro Leu Gln Leu Asp Ala Ser	
10 15 20	
ctg ggc tcc aga ggc agt gag tcg gtt ctc cgg agc ttg tct gac atc	149
Leu Gly Ser Arg Gly Ser Glu Ser Val Leu Arg Ser Leu Ser Asp Ile	
25 30 35 40	
cct ggg ccc tct aca ctc agc ttc ctg gct gaa ctc ttc tgc aaa ggg	197

8/16

Pro Gly Pro Ser Thr Leu Ser Phe Leu Ala Glu Leu Phe Cys Lys Gly	
45 50 55	
ggg ctg tcc agg ctg cat gaa ctg cag gtg cat ggc gct gcg cgg tac	245
Gly Leu Ser Arg Leu His Glu Leu Gln Val His Gly Ala Ala Arg Tyr	
60 65 70	
ggg cca ata tgg tct ggc agc ttt ggg aca ctt cgc aca gtt tac gtt	293
Gly Pro Ile Trp Ser Gly Ser Phe Gly Thr Leu Arg Thr Val Tyr Val	
75 80 85	
gcc gac cct aca ctt gtg gag cag ctc ctg cga caa gaa agt cac tgt	341
Ala Asp Pro Thr Leu Val Glu Gln Leu Leu Arg Gln Glu Ser His Cys	
90 95 100	
cca gag cgc tgt agt ttc tca tca tgg gca gag cac cgt cgc cgc cac	389
Pro Glu Arg Cys Ser Phe Ser Ser Trp Ala Glu His Arg Arg Arg His	
105 110 115 120	
cag cgt gct tgc gga ttg cta acg gcg gat ggt gaa gaa tgg cag agg	437
Gln Arg Ala Cys Gly Leu Leu Thr Ala Asp Gly Glu Glu Trp Gln Arg	
125 130 135	
ctc cga agt ctt ctg gcc ccg ctc ctc ctc cgg cca caa gca gcc gcg	485
Leu Arg Ser Leu Leu Ala Pro Leu Leu Leu Arg Pro Gln Ala Ala Ala	
140 145 150	
ggc tat gct gga act ctg gac aac gtg gtc cgt gac ctt gtg cga cga	533
Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Asp Asn Val Val Arg Asp Leu Val Arg Arg	
155 160 165	
cta agg cgc cag cgg gga cgt gcc tct ggg cta ccc gcc cta gtt ctg	581
Leu Arg Arg Gln Arg Gly Arg Gly Ser Gly Leu Pro Gly Leu Val Leu	
170 175 180	

9/16

gac gtg gca gga gag ttt tac aaa ttt ggc cta gaa agt ata ggc gcg	629
Asp Val Ala Gly Glu Phe Tyr Lys Phe Gly Leu Glu Ser Ile Gly Ala	
185 190 195 200	
gtg ctg ctg gga tgc cgc ctg ggc tgc cta gag gct gaa gtc cct cct	677
Val Leu Leu Gly Ser Arg Leu Gly Cys Leu Glu Ala Glu Val Pro Pro	
205 210 215	
gac aca gaa acc ttc ata cat gca gtg ggc tca gtg ttt gtg tct aca	725
Asp Thr Glu Thr Phe Ile His Ala Val Gly Ser Val Phe Val Ser Thr	
220 225 230	
ctc ttg acc atg gcg atg ccc aac tgg ttg cac cac ctt ata cct gga	773
Leu Leu Thr Met Ala Met Pro Asn Trp Leu His His Leu Ile Pro Gly	
235 240 245	
ccc tgg gcc cgc ctc tgc cga gac tgg gat cag atg ttt gcc ttt gcc	821
Pro Trp Ala Arg Leu Cys Arg Asp Trp Asp Gln Met Phe Ala Phe Ala	
250 255 260	
cag agg cac gtg gag ctg cga gaa ggt gaa gct gcg atg agg aac cag	869
Gln Arg His Val Glu Leu Arg Glu Gly Glu Ala Ala Met Arg Asn Gln	
265 270 275 280	
gga aag cct gag gag gat atg ccg tct ggg cat cac tta acc cac ttc	917
Gly Lys Pro Glu Glu Asp Met Pro Ser Gly His His Leu Thr His Phe	
285 290 295	
ctt ttt cgg gaa aag gtg tct gtc cag tcc ata gtg ggg aat gtg aca	965
Leu Phe Arg Glu Lys Val Ser Val Gln Ser Ile Val Gly Asn Val Thr	
300 305 310	
gag cta cta ctg gct gga gtg gac acg gta tcc aat acg ctc tcc tgg	1013
Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp Thr Val Ser Asn Thr Leu Ser Trp	

10/16

315	320	325	
aca ctc tat gag ctt tcc cgg cac ccc gat gtc cag act gca ctc cac			1061
Thr Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His Pro Asp Val Gln Thr Ala Leu His			
330	335	340	
tct gag atc aca gct ggg acc cgt ggc tcc tgt gcc cac ccc cat ggc			1109
Ser Glu Ile Thr Ala Gly Thr Arg Gly Ser Cys Ala His Pro His Gly			
345	350	355	360
act gct ctg tcc cag ctg ccc ctg tta aag gct gtg atc aaa gaa gtg			1157
Thr Ala Leu Ser Gln Leu Pro Leu Leu Lys Ala Val Ile Lys Glu Val			
365	370	375	
ttg aga ttg tac cct gtg gta cct ggg aat tcc cgt gtc cca gac aga			1205
Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val Pro Gly Asn Ser Arg Val Pro Asp Arg			
380	385	390	
gac atc cgt gta gga aac tat gta att ccc caa gat acg cta gtc tcc			1253
Asp Ile Arg Val Gly Asn Tyr Val Ile Pro Gln Asp Thr Leu Val Ser			
395	400	405	
cta tgt cac tat gcc act tca agg gac ccc aca cag ttt cca gac ccc			1301
Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser Arg Asp Pro Thr Gln Phe Pro Asp Pro			
410	415	420	
aac tct ttt aat cca gct cgc tgg ctg ggg gag ggt ccg acc ccc cac			1349
Asn Ser Phe Asn Pro Ala Arg Trp Leu Gly Glu Gly Pro Thr Pro His			
425	430	435	440
cca ttt gca tct ctt ccc ttc ggc ttt ggc aaa cgg agc tgc atc ggg			1397
Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe Gly Phe Gly Lys Arg Ser Cys Ile Gly			
445	450	455	
aga cgc ttg gca gag ctt gag cta caa atg gct ttg tcc cag atc ttg			1445

11/16

Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu Leu Gln Met Ala Leu Ser Gln Ile Leu
 460 465 470
 acc cat ttt gaa gtg cta cct gag cca ggt gct ctt cct atc aag ccc 1493
 Thr His Phe Glu Val Leu Pro Glu Pro Gly Ala Leu Pro Ile Lys Pro
 475 480 485
 atg acc cgg act gtc ctg gtc cct gag agg agc atc aat cta cag ttt 1541
 Met Thr Arg Thr Val Leu Val Pro Glu Arg Ser Ile Asn Leu Gln Phe
 490 495 500
 gta gat aga taaccattcg gaagacagcc aacatcgtct ctctcaagac 1590
 Val Asp Arg
 505
 aggatggggt ctttgttata cacaagagge acactctcct tggaggcctg tctgaccgag 1650
 caaactccag gaagcaggtc ctgacctatg tgtacttgge ctgactcage aggcacgca 1710
 gaaccacat ctttctcctt cctgctcagt gcctctcctg atcatctctc aggatccaat 1770
 gccttcagat ttttaacacat ccttaaagt ccaacgcagg ggttaactac caactccagg 1830
 cagcctgggg agggattcgc cctgatacct gtagtggtcg ttgatgctct gtctaagcat 1890
 ttatcacggc acaagctaag tgattgcac tggctgcac ctggctgcat ctctacctga 1950
 ccatgtgtgt gccttctgag aagagtaatg actagtctac tgggctttta gctctttttc 2010
 tttttgagac agagtcttgc tatgtattcc atgctgtcct ggaaattcac aacttcctg 2070
 cctcaccttt cccaagtatt gggttacaga ctgagctac cacttcagc tgtatcagtc 2130
 tttatatctc ctgccagagt ctatcccttg gttatttcag caccatacat ttctcagact 2190
 gaacctggac catgtggcag gatcgtccac tcaccagget ctgccaccc tttttctctc 2250
 ttaatctttc ctctagggaa gtaaactctgc ccttgccctaa tttacagcgt ttttaagcct 2310
 ccgetacctt ggttcttcag ccactctcaa gtggatccac tttcttatca tccatgttta 2370
 ggctgcctt tctcca 2386

12/16

<210> 4

<211> 2362

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1524)

<400> 4

atg acc cag acc ctc aag tac gcc tcc aga gtg ttc cat cgc gtc cgc	48
Met Thr Gln Thr Leu Lys Tyr Ala Ser Arg Val Phe His Arg Val Arg	
1 5 10 15	
tgg gcg ccc gag ttg ggc gcc tcc cta ggc tac cga gag tac cac tca	96
Trp Ala Pro Glu Leu Gly Ala Ser Leu Gly Tyr Arg Glu Tyr His Ser	
20 25 30	
gca cgc cgg agc ttg gca gac atc cca ggc ccc tct acg ccc agc ttt	144
Ala Arg Arg Ser Leu Ala Asp Ile Pro Gly Pro Ser Thr Pro Ser Phe	
35 40 45	
ctg gcc gaa ctt ttc tgc aag ggg ggg ctg tgc agg cta cac gag ctg	192
Leu Ala Glu Leu Phe Cys Lys Gly Gly Leu Ser Arg Leu His Glu Leu	
50 55 60	
cag gtg cag ggc gcc gcg cac ttc ggg ccg gtg tgg cta gcc agc ttt	240
Gln Val Gln Gly Ala Ala His Phe Gly Pro Val Trp Leu Ala Ser Phe	
65 70 75 80	
ggg aca gtg cgc acc gtg tac gtg gct gcc cct gca ctc gtc gag gag	288

13/16

Gly Thr Val Arg Thr Val Tyr Val Ala Ala Pro Ala Leu Val Glu Glu	
85 90 95	
ctg ctg cga cag gag gga ccc cgg ccc gag cgc tgc agc ttc tcg ccc	336
Leu Leu Arg Gln Glu Gly Pro Arg Pro Glu Arg Cys Ser Phe Ser Pro	
100 105 110	
tgg acg gag cac cgc cgc tgc cgc cag cgg gct tgc gga ctg ctc act	384
Trp Thr Glu His Arg Arg Cys Arg Gln Arg Ala Cys Gly Leu Leu Thr	
115 120 125	
gcg gaa ggc gaa gaa tgg caa agg ctc cgc agt ctc ctg gcc ccg ctc	432
Ala Glu Gly Glu Glu Trp Gln Arg Leu Arg Ser Leu Leu Ala Pro Leu	
130 135 140	
ctc ctc cgg cct caa gcg gcc gcc cgc tac gcc gga acc ctg aac aac	480
Leu Leu Arg Pro Gln Ala Ala Ala Arg Tyr Ala Gly Thr Leu Asn Asn	
145 150 155 160	
gta gtc tgc gac ctt gtg cgg cgt ctg agg cgc cag cgg gga cgt ggc	528
Val Val Cys Asp Leu Val Arg Arg Leu Arg Arg Gln Arg Gly Arg Gly	
165 170 175	
acg ggg ccg ccc gcc ctg gtt cgg gac gtg gcg ggg gaa ttt tac aag	576
Thr Gly Pro Pro Ala Leu Val Arg Asp Val Ala Gly Glu Phe Tyr Lys	
180 185 190	
ttc gga ctg gaa ggc atc gcc gcg gtt ctg ctc ggc tcg cgc ttg ggc	624
Phe Gly Leu Glu Gly Ile Ala Ala Val Leu Leu Gly Ser Arg Leu Gly	
195 200 205	
tgc ctg gag gct caa gtg cca ccc gac acg gag acc ttc atc cgc gct	672
Cys Leu Glu Ala Gln Val Pro Pro Asp Thr Glu Thr Phe Ile Arg Ala	
210 215 220	

14/16

gtg ggc tgc gtg ttt gtg tcc acg ctg ttg acc atg gcg atg ccc cac	720
Val Gly Ser Val Phe Val Ser Thr Leu Leu Thr Met Ala Met Pro His	
225 230 235 240	
tgg ctg cgc cac ctt gtg cct ggg ccc tgg ggc cgc ctc tgc cga gac	768
Trp Leu Arg His Leu Val Pro Gly Pro Trp Gly Arg Leu Cys Arg Asp	
245 250 255	
tgg gac cag atg ttt gca ttt gct cag agg cac gtg gag cgg cga gag	816
Trp Asp Gln Met Phe Ala Phe Ala Gln Arg His Val Glu Arg Arg Glu	
260 265 270	
gca gag gca gcc atg agg aac gga gga cag ccc gag aag gac ctg gag	864
Ala Glu Ala Ala Met Arg Asn Gly Gly Gln Pro Glu Lys Asp Leu Glu	
275 280 285	
tct ggg gcg cac ctg acc cac ttc ctg ttc cgg gaa gag ttg cct gcc	912
Ser Gly Ala His Leu Thr His Phe Leu Phe Arg Glu Glu Leu Pro Ala	
290 295 300	
cag tcc atc ctg gga aat gtg aca gag ttg cta ttg gcg gga gtg gac	960
Gln Ser Ile Leu Gly Asn Val Thr Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp	
305 310 315 320	
acg gtg tcc aac acg ctc tct tgg gct ctg tat gag ctc tcc cgg cac	1008
Thr Val Ser Asn Thr Leu Ser Trp Ala Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His	
325 330 335	
ccc gaa gtc cag aca gca ctc cac tca gag atc aca gct gcc ctg agc	1056
Pro Glu Val Gln Thr Ala Leu His Ser Glu Ile Thr Ala Ala Leu Ser	
340 345 350	
cct ggc tcc agt gcc tac ccc tca gcc act gtt ctg tcc cag ctg ccc	1104
Pro Gly Ser Ser Ala Tyr Pro Ser Ala Thr Val Leu Ser Gln Leu Pro	

15/16

355	360	365	
ctg ctg aag gcg gtg gtc aag gaa gtg cta aga ctg tac cct gtg gta			1152
Leu Leu Lys Ala Val Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val			
370	375	380	
cct gga aat tct cgt gtc cca gac aaa gac att cat gtg ggt gac tat			1200
Pro Gly Asn Ser Arg Val Pro Asp Lys Asp Ile His Val Gly Asp Tyr			
385	390	395	400
att atc ccc aaa aat acg ctg gtc act ctg tgt cac tat gcc act tca			1248
Ile Ile Pro Lys Asn Thr Leu Val Thr Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser			
405	410	415	
agg gac cct gcc cag ttc cca gag cca aat tct ttt cgt cca gct cgc			1296
Arg Asp Pro Ala Gln Phe Pro Glu Pro Asn Ser Phe Arg Pro Ala Arg			
420	425	430	
tgg ctg ggg gag ggt ccc acc ccc cac cca ttt gca tct ctt ccc ttt			1344
Trp Leu Gly Glu Gly Pro Thr Pro His Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe			
435	440	445	
ggc ttt ggc aag cgc agc tgt atg ggg aga cgc ctg gca gag ctt gaa			1392
Gly Phe Gly Lys Arg Ser Cys Met Gly Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu			
450	455	460	
ttg caa atg gct ttg gcc cag atc cta aca cat ttt gag gtg cag cct			1440
Leu Gln Met Ala Leu Ala Gln Ile Leu Thr His Phe Glu Val Gln Pro			
465	470	475	480
gag cca ggt gcg gcc cca gtt aga ccc aag acc cgg act gtc ctg gta			1488
Glu Pro Gly Ala Ala Pro Val Arg Pro Lys Thr Arg Thr Val Leu Val			
485	490	495	
cct gaa agg agc atc aac cta cag ttt ttg gac aga tagtcccatg			1534

16/16

Pro Glu Arg Ser Ile Asn Leu Gln Phe Leu Asp Arg

500

505

gaaagagact gtcacatca ccccttcatt catcataggg ataagatddd ttgtaggcac	1594
aagaccaagg tatacatctt cccctaagtc ctatctgacc aaactggata gaaccaccat	1654
agtgaagtgt gaggcggctc tgaccaatgt gtgaagtatg cacttggcct gactcaggaa	1714
gccaggtgag aaaacatgg tctctctgct tgcttggccc ttctgatcat gtatgcatcc	1774
cccaaggatg aaatcagatt ttaactaata atgctggatg gcctgaagga aagattcaac	1834
tgcctctctt tttgggcttt catagtgttc attgatgctg ctggctrrgc atttgtcaaa	1894
gcataagctc agtagctgtg catctggtct gnacctggtt ggtccttcgt ctttgcattg	1954
aagctctttg agaggaaggg tgaagtctta tttgtttttt atgtccctg ccagggcctg	2014
tctctgacta ggtgtcacca tacacattct tagattgaat ctgaaccatg tggcagaagg	2074
gataagcagc ttacttagta ggctctgtct acccccttcc ttctttgtct tgcccctagg	2134
aaggtgaatc tgcccctagcc tggtttacgg tttcttataa ctctccttg ctctctggcc	2194
actattaggt gggtttgccc catcacttag ttctcaggca gagacatctt tgggcctgtc	2254
cctgcccagg cctctggctt tttatattga aaatttttaa atattcacia attttagaat	2314
aaaccaaata ttccattctt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2362

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03280

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/60, 15/63, C12P21/08, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/60, 15/63, C12P21/08, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Usui, E., et al., "Molecular cloning of cDNA for vitamin D3 25-hydroxylase from rat liver mitochondria", FEBS Lett., Vol. 262, No. 1 (1990), pp.135-138	12-25 1-11, 26-27
X A	Su, P., et al., "A cDNA encoding a rat mitochondrial cytochrome P450 catalyzing both the 26-hydroxylation of cholesterol and 25-hydroxylation of vitamin D3: gonadotropic regulation of the cognate mRNA in ovaries", DNA Cell Biol., Vol. 9, No. 9 (1990), pp.657-667	12-24 1-11, 25-27
X A	Guo, Y.D., et al., "Transfected human liver cytochrome P-450 hydroxylates vitamin D analogs at different side-chain positions", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 90, No. 18 (1993), pp.8668-8672	12-24 1-11, 25-27
X A	Cali, J.J., et al., "Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underline cerebrotendinous xanthomatosis", J. Biol. Chem., Vol. 266, No. 12 (1991), pp.7779-7783	12-24 1-11, 25-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 October, 1998 (20. 10. 98)Date of mailing of the international search report
4 November, 1998 (04. 11. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03280

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Cali, J.J., et al., "Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis", J. Biol. Chem., Vol. 266, No. 12 (1991), pp.7774-7778	12-24 1-11, 25-27
X A	JP, 3-232493, A (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 16 October, 1991 (16. 10. 91) (Family: none)	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	Fu, G.K., et al., "Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1", Mol. Endocrinol., Vol. 11, No. 13 (Dec. 1997), pp.1961-1970	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	Fu, G.K., et al., "Complete structure of the human gene for the vitamin D1alpha-hydroxylase, P450C1alpha", DNA Cell Biol., Vol. 16, No. 12 (Dec. 1997), pp.1499-1507	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	St-Arnaud, R., et al., "The 25-hydroxyvitamin D1-alpha-hydroxylase gene maps to the pseudovitamin D-deficiency rickets (PDDR) disease locus", J. Bone. Miner. Res., Vol. 12, No. 10 (Oct. 1997), pp.1552-1559	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	Monkawa, T., et al., "Molecular cloning of cDNA and genomic DNA for human 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase", Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 239, No. 2 (20. Oct. 1997), pp.527-533	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	Takeyama, K., et al., "25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis", Science, Vol. 277, No. 5333 (19. Sep. 1997), pp.1827-1830	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	DDBJ, LOCUS; AB005990 4706bp DNA HUM 31-JUL-1997, ACCESSION; AB005990, Takeyama, K. "DEFINITION Homo sapiens DNA for 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase, complete cds."	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	DDBJ, LOCUS; AB001992 2426bp mRNA ROD 06-NOV-1997, ACCESSION; AB001992, Shimada, H. "DEFINITION Rattus norvegicus mRNA for VD3 1a hydroxylase, complete cds."	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	DDBJ, LOCUS; AA877142 257bp mRNA EST 29-APR-1998, ACCESSION; AA877142, NCI-CGAP" DEFINITION oh79e02.s1 NCI_CGAP_Kid3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 1473242 3' similar to TR: 015528 015528 P450 25-HYDROXYVITAMIN D-1 ALPHA"	12-24 1-11, 25-27

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁸ C12N15/60, 15/63, C12P21/08, C12Q1/68		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁸ C12N15/60, 15/63, C12P21/08, C12Q1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Usui, E., et al. "Molecular cloning of cDNA for vitamin D3 25-hydroxylase from rat liver mitochondria", FEBS Lett., Vol. 262, No. 1 (1990), pp. 135-138	12-25 1-11, 26-27
X A	Su, P., et al. "A cDNA encoding a rat mitochondrial cytochrome P450 catalyzing both the 26-hydroxylation of cholesterol and 25-hydroxylation of vitamin D3: gonadotropic regulation of the cognate mRNA in ovaries", DNA Cell Biol., Vol. 9, No. 9 (1990), pp. 657-667	12-24 1-11, 25-27
X A	Guo, Y. D., et al. "Transfected human liver cytochrome P-450 hydroxylates vitamin D analogs at different side-chain	12-24 1-11, 25-27
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 20. 10. 98	国際調査報告の発送日 04.11.98	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA, J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 村上 騎見高 印	4 B 8827
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	positions", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , Vol. 90, No. 18 (1993), pp. 8668-8672	
X A	Cali, J. J., et al. "Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underline cerebrotendinous xanthomatosis", J. Biol. Chem. , Vol. 266, No. 12 (1991), pp. 7779-7783	12-24 1-11, 25-27
X A	Cali, J. J., et al. "Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis", J. Biol. Chem. , Vol. 266, No. 12 (1991), pp. 7774-7778	12-24 1-11, 25-27
X A	JP, 3-232493, A (住友化学工業株式会社) 16. 10月. 1991 (16. 10. 91) (ファミリーなし)	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	Fu, G. K., et al. "Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1", Mol. Endocrinol. , Vol. 11, No. 13 (Dec. 1997), pp. 1961-1970	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	Fu, G. K., et al. "Complete structure of the human gene for the vitamin D1alpha-hydroxylase, P450C1alpha", DNA Cell Biol. , Vol. 16, No. 12 (Dec. 1997), pp. 1499-1507	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	St-Arnaud, R., et al. "The 25-hydroxyvitamin D1-alpha-hydroxylase gene maps to the pseudovitamin D-deficiency rickets (PDDR) disease locus", J. Bone. Miner. Res. , Vol. 12, No. 10 (Oct. 1997), pp. 1552-1559	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	Monkawa, T., et al. "Molecular cloning of cDNA and genomic DNA for human 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase", Biochem. Biophys. Res. Commun. , Vol. 239, No. 2 (20. Oct. 1997), pp. 527-533	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	Takeyama, K., et al. "25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis", Science, Vol. 277, No. 5333 (19. Sep. 1997), pp. 1827-1830	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	DDBJ, LOCUS; AB005990 4706bp DNA HUM 31-JUL-1997, ACCESSION; AB005990, Takeyama, K. "DEFINITION Homo sapiens DNA for 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase, complete cds."	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	DDBJ, LOCUS; AB001992 2426bp mRNA ROD 06-NOV-1997, ACCESSION; AB001992, Shimada, H. "DEFINITION Rattus norvegicus mRNA for VD3 1a hydroxylase, complete cds."	12-24 1-11, 25-27
P, X P, A	DDBJ, LOCUS; AA877142 257bp mRNA EST 29-APR-1998, ACCESSION; AA877142, NCI-CGAP "DEFINITION oh79e02. s1 NCI_CGAP_Kid3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1473242 3' similar to TR:015528 015528 P450 25-HYDROXYVITAMIN D-1 ALPHA"	12-24 1-11, 25-27